



TAYSE FERREIRA FERREIRA DA SILVEIRA

**“COMPOSTOS FENÓLICOS TRANSFERIDOS DA ERVA-MATE PARA OS
EXTRATOS AQUOSOS DURANTE O PREPARO DO CHIMARRÃO E DO CHÁ
MATE”**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

TAYSE FERREIRA FERREIRA DA SILVEIRA

**“COMPOSTOS FENÓLICOS TRANSFERIDOS DA ERVA-MATE PARA OS
EXTRATOS AQUOSOS DURANTE O PREPARO DO CHIMARRÃO E DO CHÁ
MATE.”**

ORIENTADOR: Helena Teixeira Godoy

COORIENTADOR: Adriana Dillenburg Meinhart

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

•
ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
TAYSE FERREIRA FERREIRA DA SILVEIRA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. HELENA
TEIXEIRA GODOY.

Assinatura do orientador

CAMPINAS, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Silveira, Tayse Ferreira Ferreira da, 1988-

Si39c Compostos fenólicos transferidos da erva-mate para os
extratos aquosos durante o preparo do chimarrão e do chá
mate / Tayse Ferreira Ferreira da Silveira -- Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.

Coorientador: Adriana Dillenburg Meinhart.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Erva-mate. 2. Fenois. 3. Derringer e Suich.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Godoy,
Helena Teixeira, 1957- II. Meinhart, Adriana Dillenburg.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Phenolic compounds transfered from yerba mate to the
aqueous extracts during preparation of chimarrao and mate tea beverage

Palavras-chave em inglês:

Yerba mate (Plant)

Phenols

Derringer and Suich

High performance liquid chromatography

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Roy Edward Bruns

Juliana Azevedo Lima Pallone

Data da defesa: 25-02-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Porf^a. Dr^a. Helena Teixeira Godoy
Orientadora
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro Titular
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Roy Edward Bruns
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Juliana Azevedo Lima Pallone
Membro Suplente
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Deborah Helena Markowicz Bastos
Membro Suplente
Universidade de São Paulo

Dedico esta dissertação a

Amaury (*in memorian*), que teve sua brilhante trajetória acadêmica interrompida. Esta vitória é pra você, tio.

Júlia, que não se conformou com o que o destino lhe insinuava, e hoje estou aqui. Esta vitória é pra você, vó.

Aurimar e Socorro, por ter me inundado de carinho, amor, apoio e dedicação. Esta vitória é *de* vocês.

Marluce, Júlia e Alexandre. Sem vocês, o caminho teria sido doloroso. Esta vitória é pra vocês.

(Ilex paraguariensis) – Engenheiros do Hawaii

Hoje eu acordei mais cedo
Tomei sozinho o chimarrão
Procurei a noite na memória
Procurei em vão...

Hoje eu acordei mais leve
Nem li o jornal
Tudo deve estar suspenso
Nada deve pesar

Já vivi tanta coisa
Tenho tantas pra viver
To no meio da estrada
E nenhuma derrota vai me vencer

Hoje eu acordei livre
Não devo nada a ninguém
Não há nada que me prenda aqui

Ainda era noite
Esperei o dia amanhecer
Como quem aquece a água
Sem deixar ferver

Hoje eu acordei
Agora eu sei
Viver no escuro...
Até que a chama se acenda
Verde quente erva ventre dentro entranhas
Mate amargo noite adentro estrada estranha

(...)

Mãos e coração, livres e quentes, chimarrão e leveza

Ilex paraguariensis
Ilex paraguariensis
Ilex paraguariensis
Ilex paraguariensis

Com ele está o braço de carne, mas conosco o SENHOR nosso Deus, para nos ajudar, e para guerrear por nós (2 Crônicas, 32:8).

AGRADECIMENTOS

“Palavras, apenas, palavras pequenas”. Mesmo com recursos limitados, tento expressar toda a minha gratidão às pessoas que me acompanharam durante essa jornada:

Primeiramente, Deus, que fez cumprir a Sua Palavra “Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”, nos momentos em que eu achei que não havia saída.

Aos meus pais, Aurimar e Socorro, à minha vó, Júlia. Sem eles eu não teria conseguido.

Ao Alexandre, sem você essa jornada teria sido dolorosa. Eu realmente não sei o que eu fiz pra merecer você.

À minha irmã, Marluce, à Julinha (é incrível como eu te amo!), por toda a torcida, apoio incondicional e momentos de alegria.

À Fofinha, pela amizade leal e verdadeira todos esses anos e pela ajuda fundamental para a conclusão deste trabalho. Espero que sejamos duas doutoras velhas chamando uma a outra de fofinha, ever!

À Elenice e à Maria Rosa, duas pessoas muito especiais, parceiras, que me surpreenderam da forma mais positiva possível. Meninas, vocês foram fundamentais para a conclusão desse trabalho.

À Professora Helena, uma pessoa maravilhosa, excelente orientadora, pela confiança depositada em mim, por sua ajuda crucial nos momentos mais críticos do trabalho, por seu companheirismo e generosidade.

À Adriana, mentora deste projeto e que deu o melhor de si, não medindo esforços para que ele fosse concluído. Ao Cristiano pelo apoio e ajuda em tantos momentos, e pelas correções de inglês (muuuuito obrigada!!!)

Ao seu Dirceu, pela ajuda inestimável com as vidrarias nos momentos de pico de trabalho. Não sei como seria sem a sua ajuda! Muito obrigada!

À Polly Port's, uma importante amizade que venho conquistando. Obrigada pelo companheirismo, pelo apoio, pelos conselhos, pelos ouvidos (foram tantas as vezes que você apenas sentou e me ouviu). Obrigada!!!!!!!

À Jéssica (adorável surpresa!), Dani Neves, Wellington, Dani Bio, Renata, Marcela, Janclei, Danilo, Chico (muito obrigada pelas vezes que eu consegui sair mais cedo porque você injetou pra mim!) e Mateus, pela companhia, momentos de descontração e ajuda nas injeções (hehehe acho que ninguém escapou de por vials para injetar!)

Ao departamento de Ciência de Alimentos, por conceder o espaço físico para a realização desse trabalho

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE GERAL

Resumo geral	xvii
Summary	xix
Introdução geral	1
Referências bibliográficas	4

REVISÃO DE LITERATURA

1 Compostos fenólicos

1.1 Definição, estrutura e classificação.....	10
1.2 Importância funcional.....	13

2 A erva-mate

2.1 Origem, distribuição geográfica e importância econômica.....	15
2.2 Composição química.....	17
2.3 Técnicas de extração e análise de compostos fenólicos em erva-mate.....	19
2.4 Bebidas preparadas a partir da erva-mate.....	22
2.5 Bebidas a base de erva-mate como fonte de compostos fenólicos.....	24
2.6 Efeitos biológicos da ingestão de bebidas a base de erva-mate associados à presença de compostos fenólicos.....	26

3 Emprego de técnicas multivariadas para otimização

de métodos de separação.....	29
-------------------------------------	-----------

Referências bibliográficas.....	31
--	-----------

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS AQUOSOS DE ERVA-MATE POR CLAE-DAD: DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA

Resumo.....	42
--------------------	-----------

Abstract.....	43
----------------------	-----------

1 Introdução	44
2 Material e métodos	47
2.1 Reagentes e amostras.....	47
2.2 Preparo das soluções padrão e amostra.....	47
2.3 Instrumentação.....	47
2.4 Desenvolvimento e otimização do método.....	48
2.4.1 Planejamento dos experimentos.....	48
2.4.2 Tratamento de dados para a otimização simultânea das respostas.....	49
2.5 Validação	49
3 Resultados e discussão	50
3.1 Testes univariados.....	50
3.2 Validação dos modelos construídos com as respostas Resolução (Rs) e Simetria (S).....	52
3.3 Otimização simultânea das respostas resolução e simetria de compostos fenólicos através da técnica de Derringer e Suich.....	58
3.4 Validação do método cromatográfico.....	62
4 Conclusão	66
5 Agradecimentos	66
6 Referências bibliográficas	66
 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA SOBRE A TRANSFERÊNCIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PREPARO DO CHIMARRÃO	
Resumo	72

Abstract	74
1 Introdução	76
2 Material e métodos	79
2.1 Amostras de erva-mate.....	79
2.2 Preparo do chimarrão.....	79
2.3 Obtenção dos extratos aquosos de chimarrão e variação da temperatura da água de infusão.....	80
2.4 Quantificação do teor de compostos fenólicos presentes na erva-mate.....	81
2.5 Instrumentação e condições cromatográficas.....	82
2.6 Tratamento estatístico dos dados.....	82
3 Resultados e discussão	83
3.1 Composição fenólica dos extratos aquosos de chimarrão.....	83
3.2 Efeito da temperatura da água de infusão sobre a concentração de compostos fenólicos durante o preparo do chimarrão.....	84
3.3 Conteúdo de compostos fenólicos e porcentagem transferida para os extratos de chimarrão.....	93
3.4 Compostos fenólicos nos extratos de chimarrão normalmente ingeridos pelo consumidor e comparação com outras bebidas.....	95
4 Conclusão	97
5 Agradecimentos	97
6 Referências bibliográficas	97

ESTUDO MULTIVARIADO DO EFEITO DO TEMPO DE INFUSÃO, DA TEMPERATURA E DO VOLUME DE ÁGUA SOBRE A EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS NO PREPARO DA BEBIDA DE CHÁ MATE

Resumo	106
Abstract	108
1 Introdução	109
2 Material e métodos	111
2.1 Reagentes e amostras.....	111
2.2 Otimização multivariada e tratamento de dados para a otimização simultânea das respostas.....	112
2.3 Instrumentação e condições cromatográficas.....	113
2.4 Quantificação dos compostos fenólicos presentes na erva-mate.....	114
2.5 Aplicação em amostras.....	115
3 Resultados e discussão	116
3.1 Otimização das condições de preparo da bebida de chá mate.....	116
3.2 Otimização simultânea das respostas concentração de ácidos clorogênicos.....	119
3.3 Conteúdo de compostos fenólicos no chá mate e porcentagem transferida para as bebidas prontas para consumo.....	122
3.4 Aplicação em amostras.....	124
4 Conclusão	127
5 Agradecimentos	127
6 Referências bibliográficas	127
Conclusão geral	135

RESUMO GERAL

As folhas e talos da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hillaire) são empregadas no preparo do chimarrão e do chá mate. Estas bebidas apresentam elevada importância biológica devido à alta concentração de compostos fenólicos presente na erva-mate. No entanto, nota-se que dados acerca da composição química de extratos obtidos simulando a forma como essas bebidas são comumente preparadas pelo consumidor ainda são escassos. Assim, neste trabalho foi investigado o efeito da temperatura da água (65°C, 75°C, 85°C e 95°C) sobre os teores de rutina e dos ácidos gálico, siríngico, cafeico, ferrúlico, *p*-cumárico, 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, transferidos da erva-mate (moída grossa e tradicional) para os extratos aquosos de chimarrão, os quais foram preparados da mesma forma como a bebida é tradicionalmente consumida. Além disso, foi realizado um estudo multivariado, utilizando-se um planejamento composto central e a técnica de otimização simultânea de respostas descrita por Derringer e Suich, para determinar as condições ótimas de preparo da bebida de chá mate (otimizando o tempo de infusão, temperatura e volume de água), com a finalidade de obter os níveis máximos de transferência dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico do chá para a bebida pronta para consumo. As condições ótimas foram utilizadas no preparo de bebidas a partir de amostras comerciais de chá mate. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Para viabilizar a determinação dos compostos nos extratos aquosos das bebidas, um método cromatográfico foi desenvolvido e otimizado utilizando-se um planejamento composto central e a função de desejabilidade de Derringer e Suich. As variáveis otimizadas foram a concentração inicial e final de metanol e tempo de gradiente. As respostas estudadas foram a resolução e a simetria dos picos. O método otimizado resultou em um gradiente de 39,4 minutos que variou de 13,9% a 40% de metanol. Os resultados dos parâmetros de validação do método indicaram que este foi adequado para a determinação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos aquosos de erva-mate. De acordo com os dados obtidos, a temperatura da água de preparo do chimarrão não afetou significativamente os níveis de compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos obtidos a partir da erva-mate tradicional. Comportamento oposto foi verificado para os extratos preparados com erva-

mate moída grossa, onde o aumento da temperatura favoreceu a obtenção de extratos com níveis mais elevados de compostos fenólicos. Quanto ao preparo do chá mate todas as variáveis estudadas apresentaram efeito positivo significativo. As condições ótimas de preparo a partir de 2 g de chá foram 16 minutos de infusão, em 300 mL de água a 95°C. As bebidas de chá mate obtidas nestas condições, a partir de amostras comerciais de chá, apresentaram teores dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico que variaram entre 3,72±0,17 mg e 31,06±8,75 mg, 0,52±0,01 mg e 6,17±0,99 mg, 0,33±0,043 mg e 26, 18±9,96 e 0,80±0,02 mg e 15,84±5,69 mg, respectivamente. Os extratos aquosos do chimarrão e do chá mate preparados apresentaram níveis elevados de compostos fenólicos e podem ser considerados como fontes potenciais destes compostos para a dieta.

Palavras chave: erva mate, infusão, compostos fenólicos, Derringer e Suich, Cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMMARY

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), a plant originated from South America, is employed for preparing “chimarrao” and the mate tea beverage. Many biological assays have postulated the beneficial consequences from the consumption of these beverages, which are rich in phenolic compounds and other phytochemicals, for the human health. However, it could be noted that there is a lack of data concerning to chemical composition of the extracts obtained by simulating the way as the beverages are popularly prepared, considering the possible variations that could exist due to the homemade preparation, as temperature and time of contact of the leaves with water. Thus, in this research it was investigated the impact of the water temperature (65°C, 75°C, 85°C and 95°C) upon the levels of gallic acid, syringic acid, caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5- dicaffeoylquinic acid and rutin transferred from yerba mate (course ground and traditional) to the aqueous extracts of “chimarrao”, obtained by reproducing in the laboratory the homemade preparation. Moreover, a multivariate study was conducted, employing a central composite design and the Derringer and Suich’s desirability function, to determine the optimal conditions of preparing the mate tea beverage, aiming to reach the maximum transference of 5-caffeoylquinic, 3,4-dicaffeoylquinic, 3,5-dicaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic acids, from the tea to the ready to drink beverages. The parameters evaluated were time of infusion, temperature and volume of water. The optimal conditions found were applied for preparing mate tea beverages from commercial tea samples. The extracts were analyzed by reversed phase high performance liquid chromatography. To make viable the analysis of the aqueous extracts, a chromatographic method was developed and optimized, using multivariate statistical techniques, as central composite design and the desirability’s function of Derringer and Suich. The optimized method was: initial concentration of methanol 13.9%, final concentration of 40% in a gradient time of 39.4 minutes. The results of the method validation indicated that it has fitted well to the phenolic compounds determination and quantification in the aqueous extracts of yerba mate. According to data, the temperature of water used to prepare “chimarrao” did not affect significantly the levels of the phenolic compounds obtained from traditional yerba mate. An opposite behavior was

verified for the extracts prepared from course-ground yerba mate, being possible to conclude that the increase of the temperature favored the obtention of extracts with higher levels of phenolic compounds. Concerning the mate tea all the variables presented statistically significant effect upon the studied system. The optimal preparing conditions from 2 g of tea were 16 minutes of infusion, in 300 mL of water at 95°C. The beverages obtained in these conditions from commercial samples of tea presented concentrations of 5-caffeoylquinic, 3,4-dicaffeoylquinic, 3,5-dicaffeoylquinic and 4,5- dicaffeoylquinic acids varying between 3.72 ± 0.17 mg e 31.06 ± 8.75 mg, 0.52 ± 0.01 mg and 6.17 ± 0.99 mg, 0.33 ± 0.043 mg and 26.18 ± 9.96 and 0.80 ± 0.02 mg and 15.84 ± 5.69 mg, respectively. It was showed that the mate beverages extracts obtained as they are homemade prepared are excellent sources of phenolic compounds, mostly of chlorogenic acid.

Key words: yerba mate, infusion, phenolic compounds, Derringer and Suich, High performance liquid chromatography

INTRODUÇÃO GERAL

Os compostos fenólicos são uma importante classe de fitoquímicos amplamente distribuídos no reino vegetal, presentes em frutas, hortaliças, cereais e bebidas. Nos últimos anos, a descoberta dos benefícios à saúde humana provenientes do consumo de alimentos ricos nessas substâncias tem despertado o interesse do mundo científico para investigar o conteúdo de compostos fenólicos em diversas matrizes alimentícias vegetais (BRAVO, 1998; BERNAL, MENDIOLA, CIFUENTES, 2011). Atualmente, a determinação de compostos fenólicos em alimentos tem sido realizada predominantemente através de cromatografia líquida de alta eficiência (KALILI, VILLIERS, 2011). A literatura sobre o tema conta com um grande número de publicações científicas, onde métodos cromatográficos com diferentes características são desenvolvidos e aplicados para a separação de compostos fenólicos. Apesar da extensa lista de métodos já desenvolvidos, a análise desses compostos ainda é um desafio, em função do seu amplo número de substâncias com grande diversidade química, estrutural e de polaridade, levando à necessidade do desenvolvimento de novos métodos cromatográficos (TSAO, YANG, 2003; REGOS, TREUTTER, 2010).

As técnicas estatísticas multivariadas como o planejamento composto central e a função de desejabilidade de Derringer e Suich, podem ser ferramentas muito úteis quando se pretende desenvolver e otimizar um método cromatográfico (BREITKREITZ, 2007; BALLUS, 2011). Os planejamentos fatoriais permitem determinar os parâmetros que afetam significativamente a separação e os possíveis efeitos de interação entre eles, com um pequeno número de experimentos, isentando o pesquisador do moroso processo de otimização univariada do método, em que cada parâmetro é variado isoladamente. Além disso, a utilização das funções de desejabilidade possibilita o tratamento estatístico simultâneo de um grande número de respostas, o que é comum nessas situações, de maneira a fornecer uma resposta global adequada aos objetivos do pesquisador (ZIVANOVIC *et al.*, 2009; MEINHART, *et al.*, 2011).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hillaire) é uma planta oriunda da América do Sul, ocorrendo no Brasil, Paraguai e Argentina nas formas nativa e cultivada. É amplamente utilizada no preparo de infusões muito consumidas na América Latina, como o

chimarrão e o chá mate (BASTOS *et al.*, 2007a). O chimarrão consiste em uma infusão parcial a quente, uma vez que a erva-mate não é totalmente imersa em água durante o seu preparo. A forma de preparo mais difundida dessa bebida caracteriza-se pela sucessiva adição de água sobre a erva-mate até que se note perda do sabor da infusão (MAZZAFERA, 1997). Devido a esta característica de consumo, a ingestão diária de chimarrão pode ultrapassar um litro por pessoa. As folhas e talos de *I. paraguariensis* também são utilizadas para o preparo da bebida de chá mate, a qual constitui o chá mais consumido no Brasil (BASTOS *et al.*, 2007a; IBGE, 2009)

A composição química da erva-mate é rica em compostos oriundos do metabolismo secundário da planta, como metilxantinas, saponinas e compostos fenólicos, aos quais têm sido associadas diversas propriedades benéficas à saúde humana. O perfil de compostos fenólicos da erva-mate é constituído majoritariamente por ácidos monocateoiquínicos, dicafeoiquínicos e seus isômeros, substâncias formadas a partir da reação de esterificação entre os ácidos cafeico e quínico, e que são membros de uma classe de compostos denominada ácidos clorogênicos (CLIFFORD, 1999; CARINI *et al.*, 1998; BASTOS *et al.*, 2007b; BRAVO, GOYA, LECUMBERRI, 2007; HECK *et al.*, 2008; DUGO *et al.*, 2009). A literatura destaca ainda a rutina como o flavonoide presente em maiores concentrações na planta, bem como a quercetina, o kaempferol, o ácido gálico e o ácido cafeico, presentes em concentrações minoritárias (FILIP *et al.*, 2001; RIBANI, 2006; MARQUES, FARAH, 2009).

Nos últimos anos, os ensaios biológicos realizados envolvendo extratos aquosos de erva-mate, têm contribuído para consolidar esta planta como uma importante aliada na prevenção ao desenvolvimento de algumas patologias. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o consumo regular de bebidas derivadas da erva-mate produzem efeitos antioxidantes, hipoglicêmicos, protetores de membranas celulares, de lipoproteínas e sobre o DNA, auxiliando na prevenção do aparecimento de doenças como aterosclerose e câncer (GUGLIUCCI, 1996; BRACESCO, *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2008; PUANGPRAPHANT *et al.*, 2011; BOAVENTURA, *et al.*, 2012)

Algumas destas propriedades benéficas à saúde são associadas aos compostos fenólicos presentes na planta (BASTOS *et al.*, 2007a). No entanto, é importante considerar que a erva-mate não é consumida na sua forma integral, e sim na forma de chás e infusões,

e que a magnitude dos efeitos benéficos esperados mediante a ingestão das bebidas derivadas da erva-mate dependem da disponibilidade dos compostos fenólicos no produto ingerido pelo consumidor. Por esse motivo, a necessidade de determinar a composição química das bebidas, bem como elucidar os efeitos das condições de preparo (tempo de infusão, temperatura da água de preparo e granulometria da planta) sobre a concentração das substâncias bioativas nos extratos ingeridos é proeminente (ASTILL, *et al.*, 2001). De acordo com diversos estudos já realizados para chás e infusões, a compreensão do efeito dessas variáveis é de extrema importância, uma vez que elas afetam significativamente a disponibilidade de compostos fenólicos nas bebidas prontas para consumo (PERVA-UZUNALIC *et al.*, 2006; RUSAK, *et al.*, 2008; KOMES *et al.*, 2010; NISHYIAMA *et al.*, 2010)

Ao investigar as metodologias de extração para determinação de compostos fenólicos em erva-mate, é possível constatar que estas foram desenvolvidas com o objetivo de caracterizar a planta. Os métodos incluem a análise de extratos orgânicos (metanólicos, etanólicos, em éter etílico, acetona) e aquosos, obtidos através de extrações exaustivas e preparo de infusões com etapas de imersão total ou decocção das folhas, macerações, agitação mecânica, diferentes números de extração, bem como o uso de tempo (5 a 20 minutos), temperatura (70°C a 100°C) e volume de água de infusão diferenciados (200 a 1500 mL). Embora a aquisição de extratos aquosos de erva-mate tenha a finalidade de aproximar-se das infusões normalmente ingeridas pelo consumidor, é possível inferir que estes métodos de extração não conseguem representar o modo peculiar de preparo do chimarrão, tampouco avaliam o efeito de diferentes condições de preparo sobre a composição fenólica desta bebida (MAZZAFERA, 1996; FILIP *et al.*, 2001; DUGO *et al.* 2009 ; MARQUES, FARAH, 2009; PAGLIOSA *et al.*, 2010; VALERGA *et al.*, 2012)

No que concerne ao chá mate e à bebida obtida após a infusão, é possível encontrar estudos que tenham investigado a composição química dos extratos preparados de forma fidedigna à realizada pelo consumidor (BASTOS *et al.*, 2005). Porém, não foram encontrados, dentre a literatura pesquisada, trabalhos que tenham avaliado o impacto das condições de preparo da bebida de chá mate, como tempo e temperatura de infusão, sobre o teor dos compostos fenólicos no produto pronto para consumo.

Diante do exposto, em função da alta quantidade de compostos fenólicos presentes em infusões a base de erva-mate, bem como da importância biológica apresentada por estas substâncias, o presente estudo julgou valiosa a iniciativa de investigar os níveis de compostos fenólicos (ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4 dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, *p*-cumárico, siríngico, gálico, ferrúlico, quercetina, rutina e kaempferol) transferidos da erva-mate para os extratos aquosos obtidos a partir do chimarrão, bem como de avaliar o efeito da temperatura da água de preparo da bebida sobre a migração destes compostos. Para tanto, foram investigados dois tipos comerciais de erva-mate, a tradicional e a moída grossa, sendo respeitadas as peculiaridades de preparo da bebida. Da mesma forma, mediante a falta de dados na literatura acerca do tema, este trabalho visou investigar, através de um estudo multivariado, o efeito das condições de preparo da bebida de chá mate (tempo de infusão, temperatura e volume de água) sobre o teor dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4 dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, com a finalidade de obter os teores máximos desses compostos na bebida pronta para consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTILL, C.; BIRCH, M.R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P.G.; MARTIN, P.T. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5340-5347, 2001.
- BALLUS, C.A.; MEINHART, C.A.; BRUNS, R.E.; GODOY, H.T. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis, **Talanta**, v.83, p.1181-1187, 2011.
- BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; SOARES, R.A.M.; TORRES, E.A.F.S. The chlorogenic acid and caffeine content of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farm Bonaerense**, v.24, n. 1, p. 91-95, 2005..
- BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. *Yerba mate*: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and aromatic plant science and biotechnology**, v. 1, n. 1, p.37-46, 2007a.

- BASTOS, D.H.M; SALDANHA, L.A.; CATHARINO, R.R.; SAWAYA, A.C.; CUNHA, I.B.; CARVALHO, P.O.; EBERLIN, M.N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v, 12, p. 423-432, 2007b.
- BRACESCO, N. DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A, NUNES, E.. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, n. 9, p. 379, 2003.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n. 11, 1998.
- 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 International Research**, v.40, p. 393-405, 2007.
- BERNAL, J.; MENDIOLA, J.A.; IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, p.758-774, 2011.
- BREITKREITZ, M.C. **Otimização simultânea de variáveis de processo e mistura em cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de mestrado. 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- BOAVENTURA, B.C.B.; DI PIETRO, P.F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; MORAIS, E.C.M.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E.L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p.657-664, 2012.
- CARINI, M. FACINO, R.M.; ALDINI, G.; COLOMBO, L. Characterization of Phenolic Antioxidants from Mate (*Ilex Paraguariensis*) by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v.2, p. 1813-1819, 1998.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates –nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 362-372, 1999.
- DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B.; MONDELLO, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 7213–7221, 2009.

- FILIP, R. LOPÉZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.774-778, 2001.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*, induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338–344, 1996.
- HECK, C.I.; SCHMALKO, M.; MEIJA, E.G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, p. 8394–8403, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>. Acesso em Dezembro 2012.
- KOMES, D.; HORZIC, D.; BELSCAK, A.; KOVACEVIC, K.; VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 43, p. 167-176, 2010.
- KALILI, K.M.; VILHERS, A. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of separation science**, v.34, p. 854-876, 2011.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370–1376, 2009.
- MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v.60, n.1, p. 67-71, 1997.
- MEINHART, A.D.; BALLUS, C.A.; BRUNS, E.R.; PALLONE, J.A.; GODOY, H.T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v.85, n.1, p.237-244, 2011.
- MIRANDA, D.D.C; ARÇARI, D.P.; PEDRAZZOLI, J.Jr; CARVALHO P. O.; CERUTTI, S.M.; BASTOS, D.H.. RIBEIRO, M.L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v.23, n. 4, p. 261-265, 2008.
- NISHIYAMA, M.F.; M.A.F.COSTA; COSTA, A.M.; SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G.; BRACHT, CK.; PERALTA, R.M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 191-196, Maio 2010.

- PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.A.. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v.122, p.173-178, 2010.
- PERVA-UZUNALIC' A.; KERGET, M. S ~; KNEZ, Z.; Weinreich , B; Otto, F.; Gruner, S. Extraction of active ingredients from green tea (camellia sinensis): extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chemistry** 96 (2006) 597–605.
- PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M.A.; VERMILLION, K.; POTTS,G.; MEJIA, E.G. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular nutrition food research**, v. 55, p.1508-1522, 2011.
- REGOS, I.; TREUTTER, D. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). **Journal of chromatography A**, v.1217, p. 6169-6177, 2010.
- RIBANI, R.M. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2006.
- RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKÍC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, V. 110, p. 852–858, 2008.
- TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v.1018, p.29-40, 2003.
- VALERGA, J.; RETA, M. LANARI, M.C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **Food Science and Technology**, v. 45, p. 28-35, 2012.
- ZIZANOVIC, L.; PROTIC, A.; ZECEVIC, M.; JOCIC, B.; KOSTIC, M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p.640-648, 2009.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Compostos fenólicos

1.1 Definição, estrutura e classificação

Os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um ou mais grupamentos hidroxila substituídos em pelo menos um anel aromático, tendo o fenol (Figura 1) como o composto de estrutura mais simples, a partir da qual todas as outras são derivadas. Constituem substâncias inerentes às plantas, sintetizadas por meio do metabolismo secundário das mesmas, principalmente por meio das vias do shikimato e do fenilpropanóide (VERMERRIS, NICHOLSON, 2006; CROZIER, JAGANATH & CLIFFORD, 2010). Eles desempenham importantes funções fisiológicas e morfológicas nestes organismos, atuando em seu crescimento e reprodução, bem como promovendo proteção contra o ataque de agentes patógenos, parasitas e predadores (BRAVO 1998; KENNEDY & WIGHTMAN, 2011). Nos alimentos, são responsáveis por parte das propriedades organolépticas de frutas e vegetais, contribuindo para a sua cor, qualidade nutricional e sensorial (BRAVO, 1998; DAI, MUMPER, 2010).

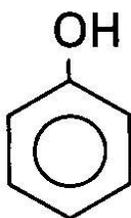


Figura 1. Estrutura química do fenol.

Estruturalmente, abrangem desde substâncias simples, de baixo peso molecular e com um único anel aromático, até compostos complexos como os taninos e derivados polifenólicos. Não existe uma única forma de classificar os compostos fenólicos. Alguns autores os classificam conforme o número de carbonos presentes na molécula (HARBONE E SIMMONDS, 1964), ou de acordo com sua distribuição na natureza (RIBÉREAU-GAYON, 1972). No que se refere àqueles comumente presentes na dieta, Crozier, Jaganath e Clifford (2009) os classificam em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides.

Os flavonoides são compostos que compreendem uma estrutura com 15 carbonos arranjados em uma configuração $C_6-C_3-C_6$. Essencialmente, consistem em dois anéis aromáticos, denominados A e B, conectados por 3 carbonos, os quais geralmente formam um anel heterocíclico, identificado como C (Figura 2). De acordo com os substituintes deste anel, os flavonoides podem ser classificados em flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas, flavanonols e antocianinas. Dentro de uma mesma classe de compostos, os flavonoides diferenciam-se segundo os substituintes nos anéis A e B, que podem ser oxigênio, cadeias alquila, acila e glicosídeos (BALASUMDRAM, SUMDRAM & SAMMAN, 2006).

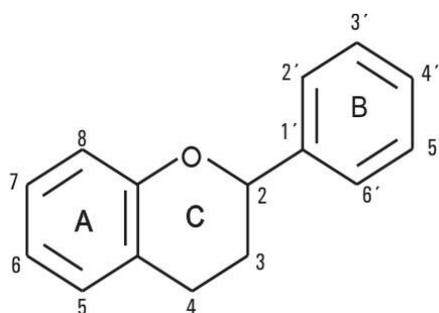


Figura 2. Estrutura genérica de um flavonoide

Dentre os flavonoides, os flavonóis constituem os mais distribuídos na natureza e com maior diversidade estrutural. Encontram-se comumente ligados a açúcares, de forma que a maioria dos compostos pertencentes a esta classe existe naturalmente na forma glicosilada (CROZIER, JAGANATH & CLIFFORD, 2010). O açúcar ligado é geralmente a glicose ou a ramnose, mas também pode ser galactose, arabinose, xilose ou outros açúcares. Comumente, a conjugação acontece apenas com um açúcar, mas pode haver dois ou três açúcares ligados à mesma molécula. Essa glicosilação pode influenciar nas propriedades químicas, físicas e biológicas do flavonoide (HORST, LAJOLO, 2012).

As substâncias compreendidas no grupo dos não flavonoides com maior relevância para a dieta incluem os ácidos fenólicos, com estrutura C_6-C_1 e o ácido cinâmico e seus derivados conjugados, com estrutura geral C_6-C_3 .

Os compostos pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos são derivados do ácido hidroxibenzóico, caracterizados pela substituição de uma carboxila no grupo fenol do anel

(Figura 3). Este grupo tem como principal representante o ácido gálico, mas conta também com os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, protocatecuico, entre outros.

Os compostos pertencentes ao grupo dos ácidos cinâmicos mais comuns na dieta são os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferrúlico e sinápico, sendo o ácido cafeico o mais encontrado nos vegetais (Figura 3) (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Estas substâncias são habitualmente encontradas nas plantas esterificadas com o ácido quínico, constituindo uma família de compostos coletivamente denominada de ácidos clorogênicos. Os ácidos clorogênicos mais largamente distribuídos no reino vegetal são os mono-ésteres do ácido cafeico (cafeoilquínicos), do ácido *p*-cumárico (*p*-cumaroilquínicos) e do ácido ferrúlico (ferrulioquínicos), os quais têm sua estrutura mostrada na Figura 4 (CLIFFORD, 1999; VERMERRIS, NICHOLSON, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Existem ainda os di-, tri, e tetra-ésteres do ácido cafeico que apresentam distribuição mais restrita (CLIFFORD, 1999). A natureza da estrutura química dos compostos fenólicos permite a formação de milhares de substâncias com características diferentes, contribuindo para a enorme diversidade e complexidade desse grupo de compostos.

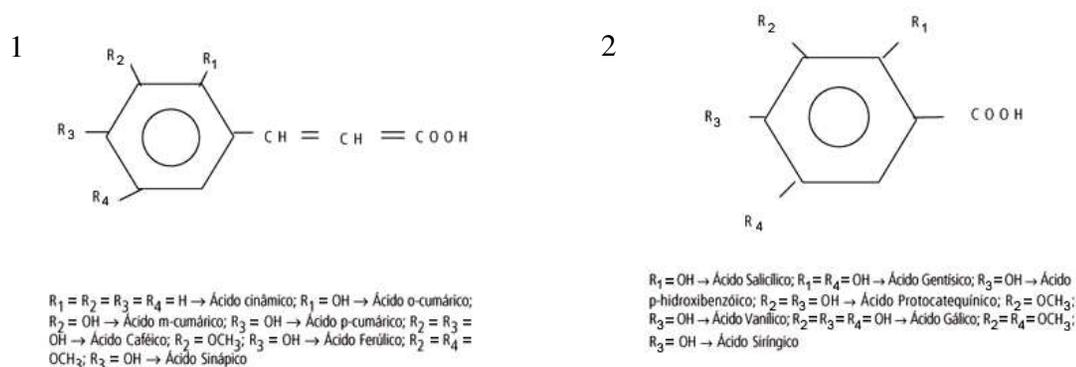


Figura 3. Estrutura química de ácidos fenólicos. 1) Derivados do ácido cinâmico e 2) derivados do ácido benzoico.



Figura 4. Estrutura química dos ácidos clorogênicos.

1.2 Importância funcional

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em frutas, vegetais, cereais, legumes, temperos, vinhos, plantas e ervas utilizadas para a produção de chás e infusões. Nos últimos anos, estudos *in vitro*, em animais e em humanos, têm demonstrado os efeitos benéficos à saúde humana resultantes do consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos, sendo observado que há uma correlação inversa entre uma dieta rica nesses alimentos e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1997; LIU, 2003; SCALBERT *et al.*, 2005).

Alguns destes efeitos estão relacionados a capacidade de combater radicais livres apresentada por estas substâncias. Os radicais livre são espécies reativas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital atômico ou molecular, naturalmente formadas durante o processo metabólico celular de seres vivos aeróbicos. As espécies reativas do oxigênio, como o íon superóxido (O_2^-), radicais peróxil $ROO\cdot$ e $HOO\cdot$, hidroxil OH e as espécies reativas do nitrogênio (NO) são formadas acidentalmente durante a fosforilação oxidativa, quando elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória “escapam” desta e, ao invés de reduzirem o oxigênio à água, formam radicais livres. Estes, devido a sua alta reatividade, são capazes de reagir com membranas celulares e com o DNA, podendo causar sérios danos às moléculas que constituem os mesmos. Embora o organismo apresente um sistema enzimático natural de defesa contra estas espécies, como a superóxido-dismutase, catalase, glutathione peroxidase, mediante a superprodução de compostos oxidantes (quadro denominado estresse oxidativo), os antioxidantes não

enzimáticos como os compostos fenólicos constituem importantes ferramentas no combate a estas espécies reativas (HALLIWELL, 1994; VALKO *et al.*, 2006).

Os grupos OH presentes na estrutura do fenol constituem a base de sua capacidade antioxidante, atuam como agentes redutores em virtude de sua habilidade de doar o hidrogênio para o radical livre, estabilizando-o. A transferência do hidrogênio para o radical livre interrompe a reação de oxidação e o radical fenox resultante é estabilizado por ressonância (Figura 5)

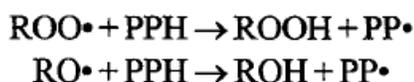


Figura 5. Mecanismo de estabilização do radical livre (ROO•) através da doação de um hidrogênio pelo composto fenólico (PPH).

Somada às suas propriedades antioxidantes, estudos têm demonstrado, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a habilidade dos compostos fenólicos em modular a atividade de certas enzimas, devido a capacidade que certos compostos fenólicos possuem de se ligar às proteínas, bem como a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, os efeitos vasoprotetores, hipoglicêmicos e a atividade anti-obesidade apresentada por esses compostos (AJAY, ANWAR-UL, MUSTAFA, 2003; SANTAGELO *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2010; ARÇARI *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2010; BOAVENTURA *et al.*, 2012; DAGLIA, 2012). Sob o aspecto tecnológico, a funcionalidade dos compostos fenólicos tem sido explorada principalmente para a estabilização de óleos comestíveis e para a obtenção de corantes naturais (SOARES, 2002).

Diante do exposto, o interesse do mundo científico por alimentos que sejam fontes de compostos fenólicos é eminente. Da mesma forma, uma vez que muitos alimentos ricos em compostos fenólicos passam por algum processo de transformação ou preparo antes de serem consumidos, como é o caso de frutas e vegetais processados, uvas utilizadas para a produção de vinhos, chás e infusões, entre outros, a investigação do conteúdo resultante de fenólicos nesses produtos é de grande importância.

2 A erva-mate

2.1 Origem, distribuição geográfica e importância econômica

O gênero *Ilex*, pertencente à família Aquifoliaceae, reúne cerca de 700 espécies, dentre elas a *Ilex paraguariensis* St. Hillaire. Nativa da região subtropical da América do Sul, a *I. paraguariensis* tem sua área de distribuição compreendendo a região centro-norte e depressão central do Rio Grande do Sul, passando por quase todo o Estado de Santa Catarina. Continua avançando pelo centro-sul do Estado do Paraná, estendendo-se a nordeste para o Estado de São Paulo. A partir do oeste do Paraná, segue para o sul do Mato Grosso do Sul, parte da Província de Misiones na Argentina e a região oriental do Paraguai. Esta distribuição corresponde a 3% da área total do continente sul-americano (Figura 6). Nestas regiões, a exploração da *I. paraguariensis* ocorre através das colheitas realizadas em herbais nativos e em herbais cultivados da planta (ROTTA, OLIVEIRA, 2005; BASTOS *et al.*, 2007; DANIEL, 2009)

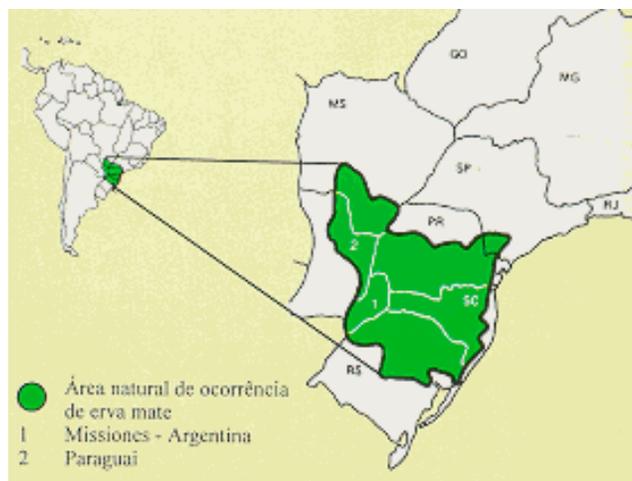


Figura 6. Distribuição geográfica da *Ilex paraguariensis* St. Hillaire.

Fonte: www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br

Economicamente, a erva-mate é um produto que vem conquistando destaque no mercado mundial nos últimos anos, devido a descoberta dos benefícios à saúde mediante o consumo de bebidas e derivados desta planta, o que tem elevado a sua importância comercial para os países que a produzem (HECK, MEJIA, 2007; MURAKAMI *et al.*, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de erva-mate, com uma produção de 425.000 toneladas, registrada em 2010. A Argentina ocupa a segunda posição, responsável por produzir 250.000 toneladas da erva em 2010, seguido do Paraguai com cerca de 85.000 toneladas produzidas neste mesmo período (FAO, 2010; SIDRA, 2010).

No Brasil, a área de ocorrência da planta corresponde a 450.000 km², o que representa cerca de 5% do território nacional (ROTTA, OLIVEIRA, 2005). A principal região produtora de erva-mate é a região Sul, responsável por 99% da produção nacional (SIDRA, 2011), sendo o restante da produção proveniente do centro-oeste brasileiro, principalmente Mato Grosso do Sul. O maior produtor de erva no país é o estado do Rio Grande do Sul, com uma produção de 272 mil toneladas em 2010, seguido pelo Paraná, com 122 mil toneladas contabilizadas neste mesmo ano, por Santa Catarina e pelo Mato Grosso do Sul, com 45 mil e 3 mil toneladas, respectivamente (SIDRA, 2011). Estima-se que em 2010, a área colhida tenha sido de 68 mil hectares (SIDRA, 2011).

O setor ervateiro nacional compreende cerca de 600 municípios da região sul e centro-oeste, com aproximadamente 750 indústrias e 180 mil propriedades rurais produtoras de erva-mate, gerando mais de 710 mil empregos diretos (RODIGHERI; DOSSA; VIELCAHUAMAN, 2009). A produção de erva-mate desempenha grande importância econômica e social para os estados que a processam, pois gera emprego e renda, principalmente para pequenos produtores e cooperativas que a produzem. O chimarrão é o maior responsável pela sustentabilidade do setor ervateiro no país, respondendo por mais de 90% da produção de erva-mate brasileira (ROTTA, OLIVEIRA, 2005).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior exportador de erva-mate em quantidade, atrás apenas da Argentina, porém, é o primeiro em faturamento. Este quadro é atribuído ao aumento de quase 30% no volume de exportações de erva-mate ocorrido na última década (FAO, 2010), o qual resultou em um acréscimo de 80% na receita de exportação desse

produto, que passou de pouco mais de 26 milhões em 2000 para mais de 50 milhões de dólares em 2010. Neste mesmo ano, foram comercializadas 33 mil toneladas do produto com o Uruguai, Síria, Estados Unidos, países da Europa, Ásia e Oriente Médio (DUTRA, 2009; FAO, 2010), regiões em que a erva-mate é utilizada para produção de bebidas energéticas e estimulantes, cápsulas de suplemento alimentar, bem como em preparações farmacêuticas, onde o extrato é empregado na manipulação de medicamentos para o tratamento de obesidade (HECK, MEJIA, 2007).

2.2 Composição química

De um modo geral, as folhas verdes de *I. paraguariensis* apresentam em sua composição açúcares, aminoácidos, fibras, vitaminas A, C e E, além de vitaminas do complexo B, e sais minerais. Quanto ao perfil fitoquímico da planta, destaca-se a presença de alcaloides (metilxantinas), saponinas triterpênicas e compostos fenólicos (GIULIAN *et al.*, 2007; DANIEL, 2009).

Os principais compostos fenólicos presentes na erva-mate são flavonoides e ácidos clorogênicos, uma família de compostos formados através da reação de esterificação de alguns ácidos derivados do ácido trans-cinâmico (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido ferrúlico) e o ácido quínico. Em função do número de moléculas destes ácidos e da posição em que ocorre a esterificação com o ácido quínico, há formação de monoésteres e diésteres de ácido cafeico (cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos), do ácido *p*-cumárico (*p*-cumaroilquínicos) e do ácido ferrúlico (ferruloilquínicos e diferruloilquínicos) (CLIFFORD, 1999). Os ácidos clorogênicos derivados da esterificação do ácido quínico com o ácido cafeico são os principais representantes dessa classe de compostos na erva-mate (Figura 7) e podem responder por cerca de 12% do peso seco da erva-mate (SCHNEIDER *et al.*, 2006).

Carini e colaboradores (1997), Bravo Lecumberri e Goya (2007), Bastos e colaboradores (2007b) e Marques e Farah (2009) caracterizaram extratos aquosos e metanólicos de erva-mate, identificando através do emprego de detectores de arranjo de diodos (LC-DAD) e espectrometria de massas (LC-MS), os cafeoilquínicos ácido 5-

cafeoilquínico (5-CQA) e seus isômeros 3-cafeoilquínico (3-CQA) e 4-cafeoilquínico (4-CQA), os dicafeoilquínicos ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-DQA), 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DQA), ácido feruloilquínico (FQA), (CQA), ácido, cafeoilglicosídeos e os flavonóis quercetina, rutina e kaempferol.

De acordo com a literatura, o teor dos ácidos 5-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA, foram encontrados em concentrações que variaram, em base seca, de 5,70 a 28,00 mg.g⁻¹, 1,00 a 8,55 mg.g⁻¹; 1,7 a 30,40 mg.g⁻¹ e 2,10 a 28,90 mg.g⁻¹, respectivamente. A concentração dos ácidos 3-cafeoilquínico e 4-cafeoilquínico oscilou entre 2,3 a 23,2 mg g⁻¹ e 1,340 a 9,00 mg g⁻¹. Além destes, o ácido ferrulioquínico, o ácido gálico e o ácido cafeico já foram encontrados em baixas concentrações (0,83 a 0,47 mg. g⁻¹, 1, 25 mg.g⁻¹ e 0,14 a 0,55 mg. g⁻¹ em base seca, respectivamente). No que concerne aos flavonoides, os representantes mais expressivos desta classe de compostos são os flavonóis, destacando-se a quercetina (0,031 mg.g⁻¹ a 3,9 mg.g⁻¹), o kaempferol (0,012 mg.g⁻¹ a 1 mg.g⁻¹) e a rutina, a qual constitui o flavonoide de maior abundância na planta, sendo encontrada em concentrações que variaram de 0,6 mg. g⁻¹ a 8,03 mg. g⁻¹. (CLIFFORD, 1990; FILIP *et al.*, 2001; RIBANI, 2006; CARDOSO JÚNIOR *et al.*, 2007; MARQUES FARAH, 2009).

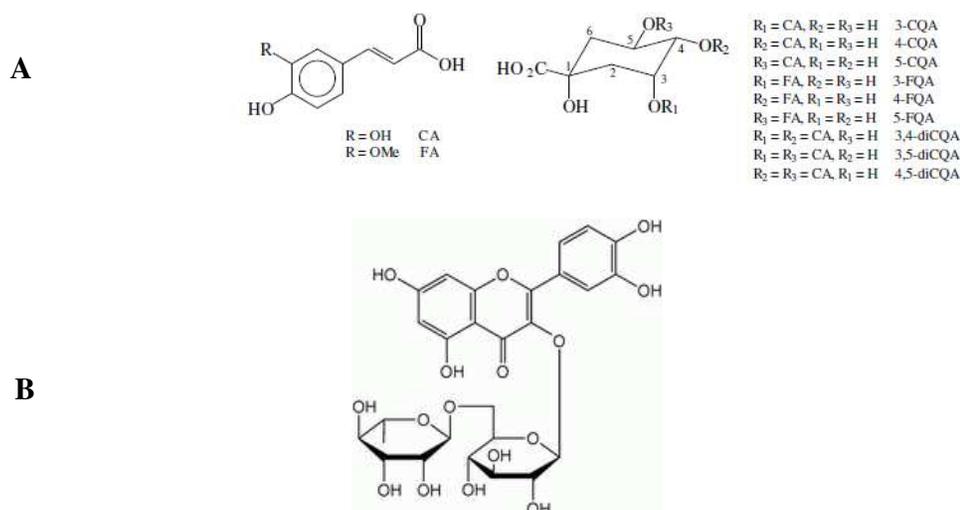


Figura 7. A) Estrutura química dos ácidos clorogênicos encontrados em extratos aquosos e metanólicos de erva-mate. **B)** estrutura química da rutina, principal flavonoide presente nesta planta.

2.3 Técnicas de extração e análise de compostos fenólicos em erva-mate

A extração constitui o principal passo para a recuperação e isolamento dos compostos fenólicos a partir das matrizes vegetais. As técnicas aplicadas visam alcançar as melhores condições de extração dos fenólicos, com a finalidade de determinar o conteúdo total desses compostos nos alimentos. As formas tradicionais de obtenção de extratos de plantas são maceração, infusão, decocção e fervura sob refluxo. Contudo, no intuito de promover extrações mais eficientes, técnicas como a extração exaustiva com Soxhlet, extração assistida por ultrassom, extração com solvente assistida por microondas, e extração com fluido super-crítico, tem sido utilizados com sucesso (ONISZCZUK, HAWRY, 2011).

Nesse contexto, verifica-se que as pesquisas para investigar o perfil de compostos fenólicos da erva-mate têm se concentrado em caracterizar a composição química da planta. Portanto, a extração é conduzida com a finalidade de potencializar a sua transferência das folhas para o solvente empregado.

Dugo e colaboradores (2009) avaliaram diferentes métodos de extração de compostos fenólicos da erva-mate (infusão, maceração, extração assistida por ultrassom e extração com fluido super-crítico), com a finalidade de obter um extrato por meio do qual a planta pudesse ser melhor caracterizada. Os autores concluíram que as infusões preparadas com 7,5 g de erva por 5 minutos em 225 mL de água, bem como os extratos obtidos a partir de 7,5 g de erva em 225 mL de metanol, através de extração assistida por ultrassom, forneceram os melhores resultados em termos de transferência dos compostos fenólicos. Bastos e colaboradores 2007b caracterizaram por injeção direta em espectrômetro de massas (ESI-MS), a composição química das folhas de erva-mate a partir de extratos etanólicos, de éter etílico e água (5 g de erva/4 horas). Já Valerga e colaboradores (2012) realizaram a extração com uma solução de acetona/água (80:20) usando um extrator Soxhlet.

Pagliosa e colaboradores (2010) conduziram a extração com metanol/água (80:20 v/v) e água (infusão a 85°C) a partir de 2 g de erva. Ambos extratos foram sonicados em ultrassom por 10 minutos e submetidos à análise cromatográfica. Marques e Farah (2009) analisaram extratos orgânicos, obtidos através de agitação a 300 rpm por 20 minutos de 1 g

de erva em metanol/água 40:60 v/v, e extratos aquosos (infusão em 190 mL de água a 95°C por 15 minutos).

No trabalho realizado por Filip e colaboradores (2001), 5 g erva-mate foi submetida ao processo de decocção em 70 mL de água por 20 minutos, Heck e colaboradores (2008) realizaram a maceração de 2,7 g de erva-mate, seguida de infusão desta em 250 mL de água a 98°C por 10 minutos.

Bastos e colaboradores (2005) e Mazzafera (1996), com o intuito de reproduzir o preparo do chimarrão em laboratório, prepararam infusões a partir de 1,5 g de erva-mate, porção que foi umedecida com água morna e disposta contra a parede do recipiente em que foi pesada. Em seguida, 70 mL de água a 85°C foram adicionados em duas partes (35 mL cada adição) para simular o modo de preparo da bebida realizado pelos consumidores. Cada alíquota de água permaneceu em contato com a erva até que a temperatura alcançasse 55°C, período após o qual os extratos aquosos resultantes foram drenados, filtrados e combinados para análises posteriores.

A metodologia mais utilizada para determinação de compostos fenólicos em erva-mate é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), acoplada a detectores UV-Vis, como o detector de arranjo de diodos (DAD), detectores de fluorescência ou espectrômetro de massas (KALILI, VILIERIS, 2011). Para separação e quantificação dos compostos fenólicos em erva-mate por CLAE foram empregadas colunas de fase reversa (C-18), com comprimento entre 15 e 25 cm e tamanho de partícula de 5 µm. As fases móveis empregadas compreenderam sistemas binários compostos por água e um solvente orgânico, geralmente metanol ou acetonitrila. Os sistemas foram conduzidos em sua maioria por eluição em gradiente. As fases móveis foram acidificadas usualmente com ácido fórmico, ácido acético glacial ou ácido fosfórico. Soluções tampões também foram utilizadas (tampão citrato). Trabalhos da literatura mostraram a separação simultânea entre 2 e 9 compostos, com tempo de análise variando entre 30 e 60 minutos. A **Tabela 1** sumariza os métodos de extração já utilizados para determinar o conteúdo de compostos fenólicos em extratos aquosos e orgânicos de erva-mate, bem como os métodos cromatográficos empregados para alcançar a separação dos compostos.

Tabela 1. Métodos de extração e análise cromatogr de compostos fenólicos em erva-mate.

Referência	Tipo de extrato	Extração	Método de determinação
Mazzafera (1996)	Aquoso	1,5 g de erva-mate, em infusão parcial com água a 85°C em 70 mL de água combinas e analisados.	CLAE – DAD-ESI-MS C18 - 250 mm x 4,6 x 5 µm Metanol:água:ácido acético Eluição isocrática
Filip e colaboradores (2001)	Aquoso	5 g de erva-mate em decoção por 20 minutos em 70 mL de água	CLAE – DAD Coluna C18 C18 - 250 mm x 4,6 x 5 µm Metanol:ácido acético Eluição em gradiente
Bastos e colaboradores (2007)	Aquoso e orgânico (etanol e éter etílico)	5 g de erva-mate em 100 mL de solvente, por 4 horas sob refluxo a 76°C, 40°C e 97°C.	ESI-Q-TOF Infusão direta
Dugo e colaboradores (2009)	Aquoso Orgânico (metanol)	7,5 g de erva-mate em 225 mL de água fervente, infusão por 5 minutos ou em metanol, por 10 min no ultrassom	CLAE bidimensional – ESI-Ion trap-TOF C18 – 150 mm X 4,6mm x 2,7 µm Acetonitrila:água Eluição em gradiente
Marques e Farah (2010)	Aquoso Hidro-alcoolico (metanol/água 40:60)	1 g de erva-mate em infusão por 15 minutos em 190 mL de água a 95°C 1 g de erva-mate na solução hidro-alcoolica, agitada por 20 minutos a 300 rpm	CLAE-DAD-ESI-MS C18 - 250 mm x 4,6 x 5 µm Metanol:ácido cítrico 10 mM Eluição em gradiente
Pagliosa e colaboradores (2010)	Aquoso Hidro-alcoolico (metanol/água 80:20)	2 g de erva-mate em infusão a 85°C, ou na solução extratora, ambos por 10 minutos no ultrassom	CLAE – DAD C18 - 25250 mm x 4,6 x 5 µm Água:acetonitrila:n-butanol Eluição isocrática
Valerga e colaboradores (1012)	Aquoso/orgânico (acetona/água 80:20)	Extração sob refluxo, repetida por 5 vezes	CLAE – DAD C18 - 250 mm x 4,6 x 5 µm Metanol:ácido fórmico Eluição em gradiente

2.4 Bebidas preparadas a partir da erva-mate

Nos últimos anos, a erva-mate vem conquistando reconhecimento mundial e se estabelecendo como uma fonte natural de compostos benéficos a saúde humana, sendo utilizada como matéria-prima para a obtenção de formulações farmacêuticas e bebidas energéticas. No entanto, em alguns países da América dos Sul, principalmente Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, as propriedades da erva-mate são conhecidas há séculos pelas populações locais, que utiliza a planta para o preparo de chás e infusões muito consumidos nestas regiões. As principais bebidas obtidas a partir das folhas e talos da erva-mate são o chimarrão, o tererê e o chá mate. (BASTOS *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2006).

O chimarrão consiste em uma infusão parcial de erva-mate em água quente. A temperatura de preparo do chimarrão constitui uma preferência pessoal, variando, geralmente, entre 70 a 85°C. A forma tradicional de preparo da bebida consiste em posicionar verticalmente uma quantidade de erva contra a parede de um recipiente denominado “cuia”, de modo que a erva ocupe cerca de 2/3 do volume do mesmo, como ilustrado na Figura 8. O espaço remanescente na cuia é então preenchido com a água aquecida. Após estas etapas, a bebida está pronta para ser consumida. A sucção é feita com o auxílio da bomba (Figura 8), uma espécie de canudo metálico, o qual contém na extremidade imersa no líquido um disco perfurado que age como um filtro durante a sucção da bebida (MEINHART *et al.*, 2010).

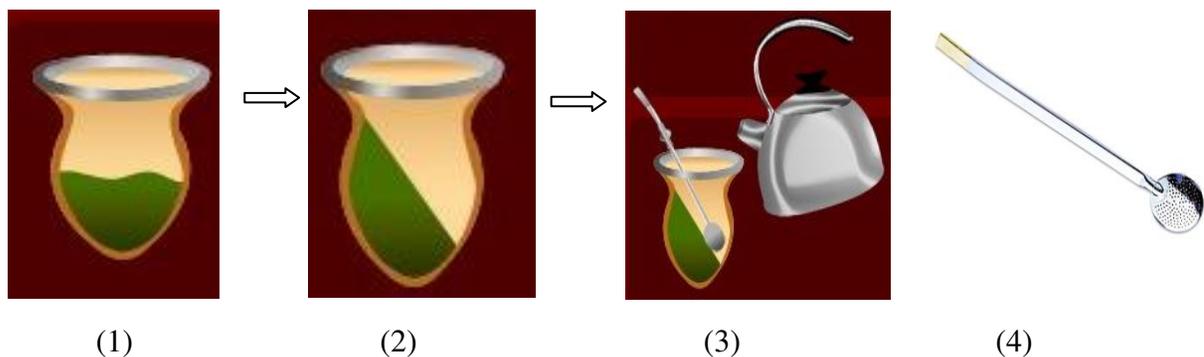


Figura 8. Etapas do preparo do chimarrão. (1) a erva é depositada na cuia e em seguida (2) posicionada verticalmente contra a parede da mesma. Finalmente (3), a água é adicionada no espaço remanescente. Em (4), a bomba de metal utilizada para succionar a bebida.

Usualmente, a mesma erva é reutilizada para o preparo de vários chimarrões através de sucessivas adições de água na cuia. O número de vezes que o volume de água é renovado constitui uma preferência pessoal, porém, de um modo geral, o apreciador reutiliza a erva para o preparo de novas bebidas até que a perda de sabor da mesma seja notada. De acordo com Meinhart e colaboradores (2010), 30 repetições são suficientes para que a perda de sabor seja pronunciada. Devido a essa característica, o hábito de consumir o chimarrão implica na ingestão diária de grandes volumes da bebida. Em países como o Brasil, Argentina e Uruguai, é comum o consumo diário de mais de um litro de extrato aquoso ingerido por pessoa (MEINHART *et al.*, 2012).

O mercado disponibiliza diferentes tipos de erva-mate para o preparo do chimarrão. Em geral, as diferenças entre as ervas comercializadas estão no tamanho de partícula após moagem, na proporção de mistura entre plantas provenientes de herbais nativos e herbais cultivados e da adição de outros ingredientes, como açúcar ou outras espécies vegetais. Não existe uma legislação que regulamente as proporções de talos e folhas na composição das ervas-mate, bem como a magnitude da moagem, de modo que as ervateiras as produzem de acordo com a aceitação do mercado consumidor. Atualmente, a legislação em rigor para a erva-mate (ANVISA, Resolução 303, 2002), discorre apenas sobre parâmetros de higiene e qualidade e regulamenta as espécies vegetais e ingredientes (açúcar, saborizantes, aromatizantes) adicionais acrescentados (MEINHART *et al.*, 2010).

As ervas-mate mais consumidas para o preparo do chimarrão são a tradicional, composta de uma mistura de folhas e talos de erva-mate proveniente de plantas nativas e cultivadas, geralmente na proporção de 50% de cada e com tamanho de partícula de 200 mesh, e a moída grossa, também constituída pela mistura de plantas nativas e cultivadas, porém com um tamanho de partícula após moagem de 500 mesh (BIZZOTO *et al.*, 2012).

O chá mate é constituído pelas folhas e talos tostados de *I. paraguariensis*. A forma de preparo da bebida pode variar em função do tipo de chá mate adquirido pelo consumidor, que pode ser em sachês ou a granel (folhas soltas). Os primeiros estão disponíveis com uma porção padrão de chá mate (cerca de 2 g) envolto em uma embalagem individual, a qual permanece sob infusão total, em água quente ou gelada, durante o período que o consumidor julgar necessário. Já na segunda forma de comercialização, o chá mate apresenta-se em embalagens com maior capacidade de armazenamento (250 g ou 500

g) e as folhas e talos encontram-se soltas e acondicionadas em um único invólucro de polietileno. A bebida é preparada adicionando-se uma certa quantidade do chá em água quente, seguida do período de infusão, que é determinado pelo consumidor, e por uma etapa de filtragem simples, para a obtenção de uma bebida livre de talos e folhas.

O chá mate é o chá mais utilizado no Brasil para o preparo de bebidas na forma de infusão total. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo anual *per capita* de chás no país é de 500 g, sendo que o chá mate corresponde a 96% desse total (0,482 kg) (IBGE, 2008).

2.5 Bebidas a base de erva-mate como fonte de compostos fenólicos

Conquanto a composição química da erva-mate já tenha sido determinada em extratos aquosos, através do preparo de infusões, e orgânicos, após extração exaustiva da planta, estudos que tenham investigado a composição química das bebidas preparadas a partir da erva-mate obtidas da forma como são preparadas pelos consumidores ainda são escassos. Estas informações são de extrema importância, já que, embora a erva-mate contenha elevados teores de compostos fenólicos, é importante considerar que ela não é consumida de forma integral, e sim, na forma de chás ou para o preparo de chimarrão.

Apesar de as extrações por infusões (chás) ou decocção já estudadas tenham visado à aproximação das condições usuais de consumo, nota-se que estas ainda se diferenciam muito da forma com que o chimarrão é preparado e consumido. Além disso, não foram encontrados, entre a literatura consultada, estudos que tenham avaliado o impacto de parâmetros como tipo de infusão (parcial ou total), tipo de erva empregado, forma de preparo (adições sucessivas de água a erva) e efeito da temperatura da água de preparo do chimarrão sobre o teor de compostos majoritários do chimarrão (cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos e flavonoides). Tendo em vista que o chimarrão é uma infusão parcial e que a infusão é rápida (cerca de 30 segundos entre a adição da água e o consumo do extrato aquoso) é importante avaliar qual a taxa de transferência de compostos fenólicos nessas situações.

Nesse sentido, Meinhart e colaboradores (2010) quantificaram o teor de compostos fenólicos totais a partir do chimarrão e do tererê, simulando fielmente a forma popular de preparo dessas bebidas. Foi observado que a taxa de transferência de compostos fenólicos totais presentes na erva-mate para os extratos aquosos variou entre 17 e 24 % (dependendo do tipo de erva-mate). Ainda, verificaram que ocorreram variações drásticas da transferência dos compostos entre os primeiros extratos aquosos e os últimos (dentre 30 estudados). Ainda assim, os níveis de compostos fenólicos totais obtidos nos extratos aquosos que normalmente são ingeridos pelo consumidor foram superiores a diversos alimentos de bebidas reconhecidos como fontes potenciais destes compostos. No entanto, nesse estudo foram avaliados somente os níveis de compostos fenólicos totais, os quais não foram separados e identificados. Mazzafera (1996) e Bastos e colaboradores (2005) simularam o preparo do chimarrão, obtendo extratos preparados a partir de 1,5 g de erva-mate, submetida à infusão parcial em um béquer com água a 85°C. Foram realizadas 2 adições de água à erva, com a finalidade de simular as repetidas adições de água sobre a erva realizada pelo consumidor. Porém, os extratos obtidos não foram analisados individualmente, de modo que o efeito da adição repetida de água sobre a concentração de compostos fenólicos em cada extrato não foi avaliado. De acordo com o primeiro autor, o teor de ácido 5-cafeoilquínico presente em 500 mL de extrato aquoso de chimarrão é de 240 mg, enquanto o segundo autor determinou que, para este mesmo volume de extrato, a quantidade média foi de 226 mg.

Paralelamente, a composição química da bebida de chá mate já foi determinada por alguns autores. Bastos e colaboradores (2005) prepararam a bebida de acordo com as instruções do fabricante (um sachê de chá em infusão por 5 minutos em 182 mL de água a 85°C,) e verificaram que uma xícara de bebida de chá mate continha, em média, 16 mg de ácido 5-cafeoilquínico. Marques e Farah (2009) avaliaram o teor de compostos pertencentes à família dos ácidos clorogênicos, em bebidas obtidas a partir de 3 marcas comerciais de chá mate. As infusões foram preparadas adicionando-se 190 mL de água a 95 °C em 1 g de chá, permanecendo em repouso por 15 minutos. Os autores verificaram teores dos ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 5-cafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico que variaram entre 0,44 a 1,51 mg, 0,63 a 2,10 mg, 3,78 a 7,51 mg e 0,97 a 3,29 mg, respectivamente, para uma xícara de 190 mL de bebida de chá mate.

Apesar destes estudos representarem o preparo da bebida chá mate de acordo com o utilizado pelo consumidor, diversos trabalhos realizados com bebidas preparadas a partir de outros chás também demonstraram que a composição química dos extratos ingeridos pelo consumidor depende diretamente da forma como o preparo do mesmo é conduzido, podendo ocorrer variações em função, por exemplo, do tempo e da temperatura da água de infusão utilizados. No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que discorram a respeito do efeito dessas variáveis sobre o teor dos compostos fenólicos na bebida de chá mate. A elucidação do efeito desses parâmetros, bem como o estabelecimento de condições de preparo que favoreçam a transferência dos compostos presentes no chá para a bebida, é de suma importância, tendo em vista as diversas publicações científicas recentes que associam as propriedades benéficas à saúde humana resultantes do consumo regular da bebida do chá mate à presença dos compostos fitoquímicos transferidos da planta para a água durante a infusão (PANG, CHOA, PARK, 2008; BOAVENTURA *et al.*, 2012.; GAO *et al.*, 2012).

2.6 Efeitos biológicos da ingestão de bebidas a base de erva-mate associados à presença de compostos fenólicos

Os chás e as infusões preparadas a partir de ervas são reconhecidos por constituírem uma das mais importantes fontes de compostos fenólicos da dieta. Os ácidos clorogênicos e os flavonóis, compostos fenólicos majoritários da erva-mate, constituem substâncias com atividade biológica de grande importância e estão associados à ação antioxidante e atimutagênica.

Filip e colaboradores 2000 avaliaram a capacidade antioxidante de 16 extratos de espécies do gênero *Ilex*, através do monitoramento *in vitro* da concentração de produtos da oxidação lipídica (TBARS: 2-thiobarbituric acid reactive substances), e observaram que a *I. paguariensis* apresentou a maior capacidade antioxidante dentre todas do gênero. Além disso, quando comparada à capacidade antioxidante do vinho tinto e do chá verde, a atividade antioxidante da erva também foi superior. Os autores encontraram alta correlação ($r = 0,94$) entre a concentração de derivados cafeoil da erva-mate (os ácidos clorogênicos

cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos) e a atividade antioxidante, o que os levou a concluir que estes compostos desempenham importante papel na capacidade antioxidante observada. Schinella e colaboradores (2000) avaliaram, *in vivo*, a atividade antioxidante de extratos aquosos de erva-mate sobre a peroxidação lipídica em fígados de rato, bem como o efeito dos extratos sobre a capacidade de sequestro de radicais livres. Os resultados demonstraram que os extratos reduziram significativamente a peroxidação enzimática e não enzimática nos sistemas biológicos, e demonstraram propriedades de redução de radicais livres.

Gugliucci e Stahl (1995) demonstraram, *in vitro*, que o extrato aquoso de erva-mate inibiu a reação de iniciação e propagação de oxidação do LDL, bem como se mostrou capaz de atuar contra a peroxidação lipídica induzida por cobre (Cu⁺). Posteriormente, *in vivo*, Guliucci (1995) avaliou o nível de oxidação do LDL em plasmas de voluntários humanos saudáveis antes e após a ingestão de extratos de erva-mate. Os dados obtidos confirmaram os resultados verificados para o teste *in vitro*. Já em 2009a, Gugliucci e colaboradores definiram que o ácido 5-cafeoilquínico foi capaz de preservar a ação antioxidante da paraoxanase (PNO 1), enzima que atua na proteção do LDL contra oxidação mediante a presença de ácido hipocloroso (HOCl), composto liberado na presença de inflamações celulares e que é capaz de reduzir a atividade desta enzima.

Recentemente (2009) em um ensaio conduzido em 102 humanos, foram fornecidas infusões a base de erva-mate (330 mL/3 vezes ao dia) para 15 indivíduos apresentando níveis normais de lipídios no sangue (normolipidêmicos), 57 com níveis acima do recomendado (dislipidêmicos) e 30 indivíduos portadores de hipercolesterolemia (elevados níveis de colesterol). Os resultados demonstraram que a ingestão das infusões promoveram decréscimo dos níveis de colesterol LDL e aumento da concentração do colesterol HDL sanguíneo em todos os grupos estudados. Além disso, foi observado que o consumo das infusões reduziu os níveis de colesterol não-HDL dos indivíduos portadores de hipercolesterolemia (DEMORAIS *et al.*, 2009).

De acordo com Roudebush e colaboradores (2004) e Belkaid e colaboradores (2006), os ácidos clorogênicos, apresentam atividade anti-tumoral e anticarcinogênica, exibindo propriedades que podem ser benéficas durante o uso de nutracêuticos em tratamentos de câncer. Nesta direção, Mejía e colaboradores (2010) verificaram, *in vitro*, que extratos aquosos de erva-mate inibiram a proliferação de células cancerosas no cólon.

Miranda e colaboradores (2008) verificaram, *in vivo*, que a ingestão regular do chá mate proporcionou maior resistência das células isoladas do fígado, bexiga e rins de ratos à peroxidação e à rupturas de estrutura, bem como melhorou o reparo da molécula de DNA.

Lunceford e Gugliucci (2005) relataram que os extratos de *I. paraguariensis* foram capazes de inibir a formação de AGEs (advanced glycation end products) em um modelo de proteína *in vitro*, através de um mecanismo similar ao observado nas drogas comerciais. Os AGEs são provenientes da formação de um aduto entre uma proteína e um açúcar redutor, reação que leva à perda de sua atividade biológica. Sua ocorrência pode desencadear complicações em diabetes microvasculares, aterosclerose e doenças degenerativas. Posteriormente, Gugliucci (2009b) e colaboradores demonstraram, *in vitro*, que as principais substâncias em erva-mate responsáveis por inibir a glicação são os ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico.

Recentemente, Pereira e colaboradores (2012) forneceram doses diárias de chá mate juntamente com soluções de glicose para ratos e constataram que o consumo dos extratos de chá estimulou a absorção de glicose no organismo, indicando que a ingestão de chá mate possui propriedades anti-hiperglicêmicas e pode auxiliar no controle da concentração sanguínea de glicose. Resultado similar foi encontrado por Klein e colaboradores (2011), ao administrar doses diárias de chá mate (330 mL/3 vezes ao dia durante 60 dias) em 29 indivíduos pré-diabéticos e 29 portadores de diabetes mellitus tipo 2.

As propriedades emagredoras da erva-mate têm sido associadas à inibição, *in vitro*, da atividade da enzima lipase, responsável pela quebra de lipídios para que estes possam ser absorvidos pelo organismo. Em 2009, Arçari e colaboradores demonstraram que ratos alimentados com dieta hipercalórica, e que recebiam uma dose diária de extrato de erva-mate, apresentaram menor ganho de peso em relação ao grupo controle. Silva e colaboradores (2011) relataram que os ratos alimentados com os extratos de erva-mate apresentaram redução da gordura intra-abdominal, demonstrando que a erva-mate pode auxiliar em tratamentos contra a obesidade. Recentemente, Cho e colaboradores (2010) determinaram que o ácido 5-CQA e o ácido cafeico possuem potente ação anti-obesidade, ao reduzir significativamente o peso e a massa visceral gorda de ratos com dieta hipercalórica. Estes compostos também promoveram redução dos triglicérides (no plasma,

fígado e coração), do colesterol (no plasma, tecidos adiposos e coração) e a inibição da síntese de ácidos graxos.

Os ensaios biológicos envolvendo extratos aquosos de erva-mate estão constantemente recebendo novas contribuições do mundo científico, de modo que a cada publicação, esta planta se consolida com uma fonte importante de compostos bioativos capazes de contribuir para a prevenção do desenvolvimento de diversas patologias.

3 Emprego de técnicas multivariadas para a otimização de métodos de separação

Uma análise cromatográfica geralmente envolve quatro etapas: preparo de amostra, separação dos compostos, identificação e quantificação dos mesmos. Destas, as etapas de preparo de amostra e separação dos compostos podem ser otimizadas empregando-se técnicas estatísticas multivariadas.

Um sistema cromatográfico pode ser afetado por muitas variáveis, as quais determinarão a qualidade de separação dos compostos de interesse. Estes fatores podem ser: a natureza da fase estacionária, a composição da fase móvel (concentração de solvente orgânico, pH, presença de ácido ou tampão) ou a programação do gradiente. Usualmente, as condições ótimas de separação de compostos são determinadas variando-se isoladamente cada um desses parâmetros, enquanto os outros são mantidos em um nível especificado. No entanto, este método clássico de otimização demanda um grande número de experimentos e, conseqüentemente, exige um tempo precioso da parte do analista. Por outro lado, a tentativa de planejar experimentos que abranjam todas as combinações possíveis desses fatores é uma opção de viabilidade prática quase nula, pois implicaria em um número de ensaios demasiado grande (GENNARO, MARENGO, ANGIOLI, 2002; TAPPIN *et al.*, 2008).

Uma solução para tais questões consiste na utilização de técnicas estatísticas multivariadas, que possuem muitas vantagens em termos de redução do número de experimentos, possibilidades aperfeiçoadas de interpretação estatística e redução do tempo total de experimentos (FERREIRA, 2007; GENNARO, MARENGO, ANGIOLI, 2002; TAPPIN *et al.*, 2008).

A otimização multivariada de sistemas de separação pode ser realizada baseando-se no seguinte procedimento:

(i) Escolher um planejamento estatístico para investigar a região experimental de interesse.

(ii) Realizar os experimentos em ordem aleatória.

(iii) Efetuar a análise de variância (ANOVA) sobre os resultados da regressão para que o modelo mais apropriado, sem evidência de falta de ajuste, possa ser usado para representar os dados.

Para tanto, modernos programas de computadores estatísticos estão comercialmente disponíveis para ajudar o pesquisador a realizar todos estes passos (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007).

Quando o trabalho envolve muitos fatores é comum a obtenção de muitas respostas e é bastante improvável que a região ótima para todas elas seja a mesma. Assim, é necessário o emprego de ferramentas estatísticas que consigam conciliar um grande número de respostas, de maneira a fornecer uma resposta global adequada aos objetivos do pesquisador. Neste sentido, pode-se trabalhar com a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich. Este método baseia-se na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo $[0,1]$, onde zero significa um valor inaceitável e um o valor mais desejável. Uma vez que as funções de desejabilidade tenham sido especificadas para todas as respostas, deve-se combiná-las em uma desejabilidade global, normalmente dada pela média geométrica das desejabilidades individuais. Com este artifício, a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global, transformando o problema em descobrir quais os níveis dos fatores que maximizam o valor da desejabilidade global (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003). Outra vantagem desta definição é que o uso da média geométrica faz com que a desejabilidade global se anule sempre quando uma das respostas tiver um valor inaceitável, não importa o quão satisfatórios sejam os valores das outras respostas. É necessário muito cuidado ao utilizar este tipo de ferramenta, pois a simples aplicação mecânica do algoritmo de busca pode produzir condições matematicamente “otimizadas”, porém sem viabilidade prática. As condições ótimas selecionadas devem ser submetidas à experimentos confirmatórios, para verificar se os

resultados obtidos através do algoritmo realmente refletem os valores empíricos (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2003; BREITKREITZ, 2007). A técnica de Derringer e Suich foi eficientemente aplicada no recente trabalho de Breitzkreitz, Jardim & Bruns (2009) para otimizar a separação de dois conjuntos, um contendo 10 compostos neutros e o outro 11 agrotóxicos, por cromatografia líquida de alta eficiência, com a obtenção de excelentes resultados. Recentemente Ballus e colaboradores (2010) e Meinhart e colaboradores (2011) aplicaram com êxito esta mesma técnica estatística para a separação de 13 compostos fenólicos presentes em azeite de oliva e 11 caboridratos presentes em matrizes alimentícias diversas, respectivamente, por eletroforese capilar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAY, M.; ANWAR-UL, H.G.; MUSTAFA; M.R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p.603-612, 2003.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; FUNK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M.F.; BASTOS, D.H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, p. 2127–2133, 2009.

BALLUS, C.A. **Otimização da separação de compostos fenólicos por eletroforese capilar e análise da composição em ácidos graxos de azeite de oliva extravirgem**. 2010. 159p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; SOARES, R.A.M.; TORRES, E.A.F.S. The chlorogenic acid and caffeine content of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farm Bonaerense**, v.24, n. 1, p. 91-95, 2005.

- BASTOS, D..H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; TORRES, E.A.F.S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.3, p.399-404, 2006.
- BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. *Yerba mate*: Pharmacological propertiers, research and biotechnology. **Medicinal and aromatic planta science and biotechnology**, v. 1, n. 1, p.37-46, 2007a.
- BASTOS, D.H.M; SALDANHA, L.A.; CATHARINO, R.R.; SAWAYA, A.C.; CUNHA, I.B.; CARVALHO, P.O.; EBERLIN, M.N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v, 12, p. 423-432, 2007b.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n. 11, 1998.
- 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 bevarages. **Food International Research**, v.40, p. 393-405, 2007.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

BELKAID, A.; CURRIE, J.C; DESGAGNÉS, J.; ANNABI, B. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell International**, v.6, n.7, 1-12, 2006.

BREITKREITZ, M.C. **Otimização simultânea de variáveis de processo e mistura em cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de mestrado. 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BIZZOTO, C.S.; MEINHART, A.D.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BALLUS, C.A.; GODOY, H.T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, p. 763-768, 2012.

BOAVENTURA, B.C.B.; DI PIETRO, P.F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; MORAIS, E.C.M.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E.L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p.657-664, 2012.

CARDOSO JÚNIOR, E. L.; FERRARESE- FILHO, O.; CARDOSO FILHO, L.;FERRARE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 553-558, 2007.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates –nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

- CHO, A.S.; JEON, S.M.; KIM, M.J.; YEO, J.; SEO, K., CHOI, M.S., LEE, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 937–943, 2010.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, v. 26, p. 1001-1043, 2009.
- DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n.2, p. 174-181, 2012.
- DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. Dourados, MS: Ed. UFGD, 2009. 288p.
- DE MORAIS E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; BOAVENTURA, B.C.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E.L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n.23, p. 8316-8324, 2009.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214, 1980.
- DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, p. 505-512, 2006.
- DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B.; MONDELLO, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass

spectrometry for the characterization of mate extracts. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 7213–7221, 2009.

DUTRA, F.L.G. **Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada Em sistemas de estacionamento natural e acelerado**. 77p. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Alimentos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BARROS NETO; B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.

Food and agriculture organization (FAO). Disponível em: <http://faostat.fao.org>.

FILIP, R. LOPÉZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.774-778, 2001.

FILIP, R.; LOLITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, vol. 20, n. 10, p. 1437-1446., 2000.

GIULIAN R. G., SANTOS, C. E. I., SHUBEITAS. M., SILVA, L. M., DIAS, J. F., YONEAMA, M. L. C. Elemental Characterization of Commercial Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after Hot Water Infusion Using Ion Beam Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 741-746, 2007.

GAO, H. LIU, Z.; WAN, W.; QU, X. CHEN, M. Aqueous extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Phytotherapy research**, Published online in Wiley Online Library, 2012.

- GUGLIUCCI, A., STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 35, p. 47–56, 1995.
- GUGLIUCCI, A., BASTOS, D.H.H. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, p. 138–142, 2009a.
- GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J.. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, p. 339–344, 2009b.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p.253-265, 1994.
- HABONE, J.B. SIMMONDS,N.W. **Biochemistry of phenolic compounds**: Academic Press, London, 101p., 1964.
- HECK, C.I.; MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n.9, 2007.
- HECK, C.I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E.G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, p. 8394–8403, 2008.
- HORST, A.M.; LAJOLO, F.M. **Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos**. Disponível em:
<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Biodisponibilidade.pdf>. Acesso em Novembro, 2012.

- KALILI, K.M.; VILHERS, A. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of separation science**, v.34, p. 854-876, 2011.
- KENNEDY, D.O. ; WHIGHTMAN, E.L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, v. 2, p.32-50, 2011.
- KLEIN, G.A.; STAFANUTO, A.; BOAVENTURA, B.C.; DE MORAIS, E.C.; CAVALCANTE L.da S.; de ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E.L **Journal of the American college nutrition**, v. 30, n.5, p 320-332, 2011.
- LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American journal of clinical nutrition**, v. 78, p.517S-520S, 2003.
- LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v.76, p.419-427, 2005.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370–1376, 2009.
- MEINHART, A. D.; BIZZOTO, C.S.; BALLU, C.A.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; CERRO-QUINTANA, R.S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H.T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 58, p.2188-2193, 2010.
- MEINHART, A.D.; BALLUS, C.A.; BRUNS, R.E.; PALLONE, J.L.A.; GODOY, H.T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, p.237-244, 2011

- MEJÍA, E.G.; SONG, Y.S.; HECK, C.I.; RAMÍREZ-MARES, M.V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23 – 34, 2010.
- MIRANDA, D.D.C; ARÇARI, D.P.; PEDRAZZOLI, J.Jr; CARVALHO P. O.; CERUTTI, S.M.; BASTOS, D.H. RIBEIRO, M.L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v.23, n. 4, p. 261-265, 2008
- MURAKAMI, A.N.N. AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMANTE, D.R.; ZANOTTA, L.M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J.C.C; TEÓFILO, R.F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A.St.Hil) extract nanofiltration. **Food Science and technology**, v. 44, n, p. 2211-2216, 2011.
- ONISZCZUK, A.; HAWRY, A. **Sample Preparation of Plant Material**. In: High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J. CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 2011.
- PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.A.. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v.122, p.173-178, 2010.
- PANG, J.; CHOA, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p.178-185, 2008.
- PEREIRA, D.F.; KAPPEL, V.D.; CAZAROLLI, L.H.; BOLINGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; GUESSER, S.M.; DA SILVA, E.L.; SILVA, F.R.M.B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v.19, p.868-877, 2012.

- RIBANI, R.M. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2006.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, n.4, p.152-129, 1997.
- RIBÉREAU-GAYON, P. **Planta phenolics**: Oliver and Boyd, Edinburg, 254p., 1972.
- RODIGHERI, H. R.; DOSSA, D.; VIELCAHUAMAN, L. J. M. **Cultivo da erva-mate**. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate/01_importancia_socioec.html. Acesso em: Dezembro, 2012.
- ROUDEBUSH, P., DAVENPORT, D.; NOVOTNY, B. The use of nutraceuticals in cancer therapy. **Veterinary. Clinical. North American. Small Animal. Pract.**, n. 34, p. 249–269, 2004
- ROTTA, E.; OLIVEIRA, Y.M.M. **Cultivo de erva-mate**, 2005. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate/02_distrib_geografica.html. Acesso em: 04 de Dezembro 2011.
- SANTAGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann Ist Super Sanità**, v. 43, n.4, p. 394-405, 2007.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.
- SCHINELLA, G.R., TROIANI, G.; DÁVILA, V; BHUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357–360, 2000.

SILVA, R.D.; BUENO, A.L.; GALLON, C.W.; GOME, L.F.; KAISER, S.; PAVEI, C. ORTEGA, G.G.; KUCHARSKI, L.C.; JAHN, M.P. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, p. 818–826, 2011.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA (SIDRA). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=1613>. Acesso em Dezembro 2012.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 14, n.1, p.71-81, 2002.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic Compound Biochemistry. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.

YU, S.; CHEUNG, K.L.; LI, W.; KONG, A. plant phenolic compounds: modulation of cytoprotective enzymes and Nrf2/ARE signaling. **Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology**. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470531792.ch17/pdf>. Acesso em Dezembro 2012.

**“DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS
AQUOSOS DE ERVA-MATE POR CLAE-DAD:
DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA”**

Tayse F. Ferreira da Silveira, Adriana D. Meinhart e Helena T Godoy

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

Um método para a separação e quantificação de dez compostos fenólicos (ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, rutina e ácido 4,5-dicafeoilquínico) através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e otimizado. O método foi otimizado empregando um planejamento composto central para avaliar o efeito da concentração inicial e final de metanol na fase móvel e o tempo de gradiente linear sobre a resolução entre os picos e a simetria dos mesmos. A partir dos modelos matemáticos ajustados obtidos, as 26 respostas foram simultaneamente otimizadas utilizando a função de desejabilidade de Derringer e Suich. A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 e a condição ótima de análise foi alcançada com as seguintes condições cromatográficas: concentração inicial de metanol na fase móvel de 13,9%, concentração final de 38,9%, em um tempo de gradiente linear de 39,4 minutos. De acordo com a validação de método realizada, o mesmo apresentou ajuste para um modelo linear ($p > 0,05$) nas faixas de concentração estudadas para os compostos e apresentou valores de repetitividade e precisão intermediária satisfatórios, indicando ser adequado para a determinação e quantificação de compostos fenólicos em extratos aquosos de erva-mate.

Palavras chave: erva-mate, método, otimização multivariada e Derringer e Suich

ABSTRACT

A new method for separation and quantification of ten phenolic compounds by High Performance Liquid Chromatography has been developed. For method optimization, a central composite design was used to evaluate the effect of initial and final concentration of methanol in the mobile phase and the gradient time on the resolution and symmetry value of the peaks. The optimization was conducted using an added standard food matrix. From the adjusted math models acquired, the responses were simultaneously optimized employing the Derringer's desirability function. The separation was carried out in a reversed phase column (C18) and the optimized method resulted in the following chromatography conditions: 13.9% of initial concentration of methanol, 38.9% of final concentration of methanol, in a gradient time of 39.4 minutes. According to the validation parameters, the developed method is able to accomplish quantitative and qualitative analysis in aqueous extracts of yerba-mate, by the fact of presenting good linearity in the studied range of compounds concentrations, as well as good repeatability and reproducibility.

Key words: yerba mate, multivariate optimization and Derringer and Suich

1 INTRODUÇÃO

Usualmente, as condições cromatográficas para a separação de compostos são definidas através de etapas de otimização de método, o que inclui a otimização da composição da fase móvel, tipo de coluna, sistema de eluição e programa de gradiente de eluição. Em geral, o efeito dessas variáveis sobre a separação é avaliado variando-se um parâmetro por vez. No entanto, além de constituírem um processo moroso, pois requerem tempo e um grande número de experimentos, os métodos univariados de otimização não são capazes de fornecer informações acerca dos possíveis efeitos de interação entre as variáveis investigadas, podendo comprometer a confiabilidade do resultado da otimização obtida (DIAS, 2011; MEINHART *et al.*, 2011).

Em razão disso, os métodos cromatográficos têm sido frequentemente alvo de otimização através da aplicação de técnicas estatísticas multivariadas, como o delineamento composto central (BREITKREITZ, 2007; FERREIRA, 2007; TAPPIN *et al.*, 2008; BARMAPALEXIS, KANAZE, GEORGARAKIS, 2009; ZIVANOVI *et al.*, 2009). Entretanto, em função do elevado número de respostas geralmente obtido a partir destas otimizações, é bastante improvável que a região ótima para todas elas seja a mesma. Assim, torna-se interessante o emprego de ferramentas estatísticas que consigam lidar com um grande número de respostas, de maneira a fornecer uma resposta global adequada os objetivos do pesquisador (BALLUS, 2010). Neste sentido, pode-se trabalhar com a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich (1980), como no trabalho de Breitzkreitz, Jardim e Bruns (2009) e Meinhart e colaboradores (2011).

Dentre os sistemas cromatográficos para os quais estas ferramentas estatísticas podem ser aplicadas, estão aqueles desenvolvidos com a finalidade de determinar compostos fenólicos, uma importante classe de fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, presentes em frutas, vegetais, cereais, legumes, vinho, azeites e chás. (DIMITRIOS, 2006; FARAH, DONANGELO, 2006). Nas últimas décadas, estes compostos têm recebido grande atenção da esfera científica por apresentar propriedades benéficas à saúde humana, com destaque para sua capacidade de atuar como antioxidante em sistemas biológicos, auxiliando na prevenção do desenvolvimento de doenças cardíacas, câncer e patologias neurodegenerativas (TAPIERO *et al.*, 2002).

Embora a literatura sobre o tema apresente uma lista extensa de métodos desenvolvidos para a determinação de compostos fenólicos em alimentos, a complexidade dessa classe de compostos, ainda nos dias atuais, torna a análise um desafio, em função de seu amplo número de substâncias com grande diversidade química, estrutural e de polaridade, levando à necessidade do desenvolvimento de novos métodos cromatográficos (KALILI, VILLIER, 2011; TSAO, YANG, 2003). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é irrefutavelmente a técnica mais empregada para a determinação individual de fenólicos em matrizes alimentícias (KALILI, VILLIER, 2011), porém, o emprego de técnicas estatísticas para a separação de compostos fenólicos presentes na dieta foi pouco explorada. Nesse sentido, Ballus, (2010), utilizando planejamento composto central e a função de desejabilidade de Derringer e Suich, obteve êxito na separação de 13 compostos fenólicos de azeite de oliva, porém utilizando eletroforese capilar. No que se refere à separação por CLAE, dentre a literatura pesquisada, apenas o trabalho realizado por Wang, Harrison e Clark (2006) utilizou um delineamento composto central para separação de cinco compostos fenólicos (ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido ferrúlico e ácido *p*-cumárico), além de outros ácidos orgânicos. Os parâmetros otimizados pelos autores foram concentração de metanol na fase móvel, pH do tampão e concentração do tampão na fase móvel e as respostas avaliadas foram resolução entre os picos e tempo de retenção. Os autores concluíram que os modelos matemáticos ajustados obtidos a partir do delineamento estatístico constituíram uma estratégia eficiente de otimização do método cromatográfico. Ressalta-se, no entanto, que neste estudo a função de desejabilidade não foi empregada, que o método não foi validado e que não foi aplicado em amostras reais.

Dentre as matrizes alimentícias que se destacam como fonte de compostos fenólicos para a dieta, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hillaire), planta nativa da América do Sul e amplamente consumida na forma de infusões nesta região, possui altas concentrações de ácidos clorogênicos, uma família de compostos constituída por isômeros mono e dicafeoilquínicos de ésteres do ácido cafeico com o ácido quínico (BASTOS *et al.*, 2007; MARQUES, FARAH, 2009). A literatura relata ainda a presença do ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico e rutina (MARQUES, FARAH, 2009; PAGLIOSA *et al.*, 2010, BIZZOTO *et al.*, 2012). Os polifenóis presentes na erva-

mate têm sido associados a algumas atividades biológicas verificadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que os extratos aquosos da planta apresentam alta capacidade antioxidante, efeitos protetores sobre membranas celulares, lipoproteínas e sobre o DNA, o que significa que o consumo de bebidas a base de mate pode auxiliar na prevenção do risco de patologias coronárias, aterosclerose e câncer (HECK, MEJIA, 2007; BRACESCO *et al.*, 2011; FILIP *et al.*, 2000; GUGLIUCCI, 1996).

Em face da importância biológica dessa planta e das bebidas derivadas dela, diversos métodos cromatográficos já foram desenvolvidos para determinação de compostos fenólicos em extratos orgânicos e aquosos de erva-mate. Os métodos por CLAE que constam na literatura foram otimizados de forma univariada, empregando-se colunas de fase reversa (C18), com comprimento entre 15 e 25 cm e tamanho de partícula de 5 µm. As fases móveis empregadas compreenderam sistemas binários compostos por água e um solvente orgânico, geralmente metanol ou acetonitrila. As fases móveis foram acidificadas usualmente com ácido fórmico, ácido acético glacial ou ácido fosfórico. Soluções tampões também foram utilizadas (tampão citrato). Os sistemas foram conduzidos de forma isocrática ou em gradiente, de acordo com a complexidade química dos compostos fenólicos separados. Trabalhos da literatura mostraram a separação simultânea entre 2 e 9 compostos, com tempo de análise variando entre 30 e 60 minutos (FILIP *et al.*, 2001; HECK; SCHMALKO; MEJIA, 2008; MARQUES, FARAH, 2009, PAGLIOSA *et al.*, 2010; VALERGA *et al.*, 2012). No entanto, de acordo com a literatura pesquisada, não existem métodos cromatográficos por CLAE otimizados através do uso de técnicas estatísticas multivariadas para atingir a separação de compostos fenólicos presentes em extratos aquosos de erva-mate.

Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método de separação e quantificação de 10 compostos fenólicos presentes em extratos aquosos de erva-mate através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e amostras

Para o preparo das fases móveis foram utilizados metanol grau cromatográfico (Merck, Alemanha) e ácido fórmico grau analítico (Ecibra, Brasil). A água foi purificada utilizando-se sistema Milli-Q[®] (Millipore). Os padrões de compostos fenólicos ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, rutina e ácido 4,5-dicafeoilquínico foram adquiridos da Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China). As fases móveis foram filtradas em membranas de porosidade 0,22 µm (Millipore) de fluoreto de polivinilideno (PVDF) para os solventes orgânicos e celulose para as soluções aquosas. As amostras utilizadas na otimização foram adquiridas em supermercados da região metropolitana de São Paulo.

2.2 Preparo das soluções padrão e amostras

As soluções estoque de padrão foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg.mL⁻¹ e armazenadas a -18°C por no máximo 1 mês. Para o preparo do mix de padrões, alíquotas de cada composto fenólico foram diluídas em água ultra-pura na concentração de 0,01 mg.mL⁻¹. Para o desenvolvimento do planejamento composto central, além da solução mix de padrões, foram utilizados extratos aquosos de erva-mate adicionados de padrão.

As soluções padrão e as amostras utilizadas no planejamento foram filtradas em filtro PVDF 0,22 µm de poro (Millipore).

2.3 Instrumentação

A separação dos 10 compostos fenólicos estudados foi realizada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent (Agilent Technologies, Alemanha), modelo 1100, acoplado a um detector de arranjo de diodos, sistema de bombas quaternário, injetor automático da HP (Hewlett Packard, Alemanha) e

forno para controle de temperatura. A coluna analítica utilizada foi de fase reversa C18 ACE (Suíça) com 100 X 4,6 mm e 3 µm de tamanho de partícula. A detecção foi realizada a 280 nm durante a etapa de otimização e, para a validação, a 280 nm ou 325 nm, de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima de cada composto. A concentração final e inicial de metanol na fase móvel e o tempo de gradiente linear foram otimizados. Para a análise e tratamento dos dados, foi utilizado o *software* HP-Chemstation.

2.4 Desenvolvimento e otimização do método

2.4.1 Planejamento dos experimentos

A determinação dos parâmetros e da região experimental investigados na otimização multivariada foram definidos a partir de estudos de otimização multivariada para métodos cromatográficos existentes na literatura, de metodologias descritas na literatura para determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência e de testes univariados realizados na fase inicial da concepção do método. Os testes consistiram em variar a programação do gradiente para verificar a influência dessas modificações sobre a eficiência de separação dos compostos. Todos os testes univariados foram realizados injetando-se 30 µL de solução mix de padrões, sistema de eluição sempre em gradiente com fase móvel composta por metanol: solução aquosa de ácido fórmico 0,1%.

A partir dos resultados dos testes univariados, o planejamento composto central foi construído de forma a avaliar os efeitos das variáveis concentração inicial e final de metanol na fase móvel e tempo de gradiente linear. Os níveis das variáveis investigados no planejamento composto central estão indicados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Níveis experimentais para o planejamento composto central 2³

Variáveis	Níveis codificados e decodificados				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Concentração inicial de metanol (%)	10	12,04	15	17,97	20
Concentração final de metanol (%)	40	44,04	50	55,95	60
Tempo de gradiente linear (minutos)	20	24,04	30	35,9	40

Todos os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória. O ponto central do planejamento foi analisado em quadruplicata, totalizando 18 experimentos. Cada nível experimental foi aplicado em solução padrão e em amostra adicionada de padrão. Antes de serem executadas as corridas com as condições indicadas pelo planejamento fatorial, a coluna cromatográfica foi condicionada durante 30 minutos com a composição inicial da fase móvel do respectivo nível experimental.

2.4.2 Tratamento de dados para a otimização simultânea das respostas

Os critérios cromatográficos escolhidos como resposta foram resolução entre os picos e o valor de simetria dos mesmos. A resolução foi calculada para pares de picos adjacentes e o valor da simetria foi diretamente fornecido pelo *software* HP-Chemstation. O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com o auxílio do programa estatístico Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). Os modelos matemáticos gerados foram validados através de análise de variância (ANOVA), ao nível de 95% de confiança. Em seguida, para determinar a condição ótima de separação dos 10 compostos fenólicos estudados, foi utilizada a técnica de Derringer e Suich, estipulando-se um valor de desejabilidade para cada resposta e, posteriormente, combinando-se em uma desejabilidade global (BREITKREITZ, JARDIM & BRUNS, 2009).

2.5 Validação

Uma vez otimizado, o método foi validado utilizando-se uma solução mix com os padrões de cada composto, de acordo com as recomendações do Guia Harmonizado (IUPAC Technical Report, 2002). Os limites de detecção e quantificação foram determinados através de diluições sucessivas das soluções padrões e estimados como sendo 3 e 5 vezes a relação sinal/ruído, respectivamente (RIBANI, *et al.*, 2004; PASCHOAL, *et al.*, 2008). O limite de quantificação foi estabelecido com base no menor nível que apresentou coeficiente de variação relativo aceitável para a concentração avaliada. Curvas analíticas, incluindo 8 níveis de concentração para cada composto estudado, foram

construídas em diferentes faixas de concentração, levando-se em consideração as concentrações esperadas nas amostras, tomando como base os dados da literatura. As curvas foram construídas em triplicatas aleatórias. A linearidade das curvas analíticas foi avaliada e o modelo linear foi validado através de análise de variância (ANOVA). A precisão do método foi avaliada injetando-se uma solução padrão contendo os 10 compostos em concentrações que contemplaram o intervalo linear do método. Para a avaliação da repetitividade, foram realizadas dez determinações em um mesmo dia, incluindo as concentrações do limite de quantificação de cada composto, de um ponto intermediário da curva e uma concentração na extremidade da curva. A precisão intermediária foi avaliada através de cinco determinações, nos mesmos níveis de concentração que para a repetitividade, em três dias diferentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes univariados

Os testes preliminares empregaram o gradiente proposto por Filip e colaboradores (2001). O gradiente consistiu de A (ácido fórmico 0,1%) e B (metanol) e a programação foi: 15%-40%B em 30 minutos, 40-75%B em 10 minutos, 75-85%B em 5 minutos. Como pode ser depreendido da Figura 1, dentre os compostos fenólicos analisados, os ácidos 3,4-dicafeoilquínico e 3,5 -dicafeoilquínico (picos 7 e 8, respectivamente) permaneceram parcialmente coeluídos, constituindo os pares de picos críticos para a separação.

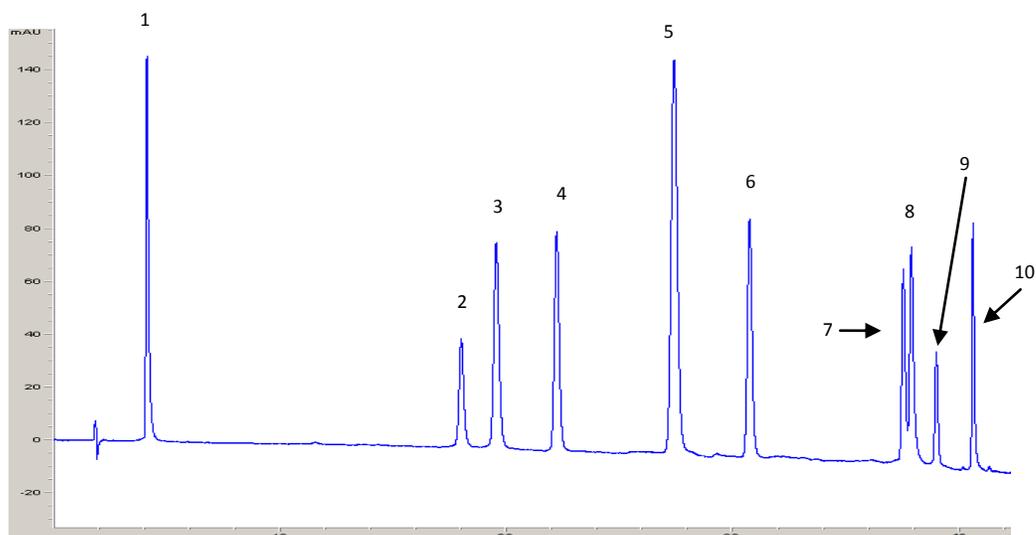


Figura 1. Perfil cromatográfico obtido a partir do programa de gradiente de Filip *et al.*, (2001). 1) Ácido gálico 2) Ácido 5-cafeoilquínico, 3) ácido cafeico 4) ácido siríngico 5) ácido *p*-cumárico 6) ácido ferrúlico 7) ácido 3,4-dicafeoilquínico, 8) ácido 3,5-dicafeoilquínico 9) Rutina 10) ácido 4,5-dicafeoilquínico.

A partir deste resultado, foram realizados ensaios variando-se a programação do gradiente para avaliar a influência da modificação de seus parâmetros na eficiência de separação dos picos referentes aos ácidos 3,4–dicafeoilquínico e 3,5–dicafeoilquínico. Estes experimentos consistiram em variar a concentração inicial e final de metanol, bem como o tempo do gradiente, sempre fixando-se o valor de duas variáveis e modificando-se apenas o valor da terceira, no sentido de direcionar as variáveis a serem estudadas e a região experimental a ser investigada. Como resultado, foi constatado que a concentração inicial de metanol constitui uma variável muito importante para a separação dos compostos fenólicos, como também verificado por Sanli e colaboradores (2002). No que se refere à separação dos picos críticos (ácidos 3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico), os testes demonstraram que modificações no tempo de gradiente e na concentração final de metanol resultavam em diferentes eficiências de separação para este par de compostos. Portanto, foi estabelecido que as variáveis concentração inicial e final de metanol e tempo de gradiente seriam incluídas no planejamento composto central.

3.2 Validação dos modelos construídos com as repostas Resolução (Rs) e Simetria (S)

A partir dos testes preliminares univariados foi observado que os pares de picos críticos para a separação foram os isômeros ácido 3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico (Figura 1). Assim, a otimização foi conduzida com a finalidade de maximizar a resolução entre os picos dos ácidos 3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico e diminuir o tempo de corrida, sem prejudicar a separação dos demais.

A solução padrão e a amostra adicionada de padrão foram submetidas a todos os níveis experimentais. Este procedimento teve como objetivo verificar se a condição experimental ótima obtida para a separação dos compostos em solução padrão não seria prejudicada pela presença de possíveis interferentes e existência de efeitos de matriz, os quais poderiam impedir a aplicação do método em amostras verdadeiras, como já observado por Dias (2011). Todavia, após o tratamento estatístico dos dados, constatou-se que os modelos foram mais bem ajustados às repostas produzidas em amostra adicionada de padrão. Além disso, a otimização em amostra representou de forma muito mais fiel uma situação real de análise, pois permitiu visualizar o comportamento dos compostos de interesse em relação aos interferentes e avaliar a existência de efeitos de matriz em cada um dos níveis experimentais estudados. Por estes motivos, optou-se por realizar a otimização simultânea das repostas em amostra adicionada de padrão.

Assim, foram obtidas 26 repostas, considerando-se os valores de simetria, a resolução entre os compostos de interesse e os picos interferentes adjacentes aos compostos de interesse, sendo: resoluções entre ácido gálico/interferente 1 (GAL/INT1), interfereinte 2/Ácido 5-cafeoilquínico (INT2/5CQ), ácido 5-cafeoilquínico/interferente 3 (5CQ/INT3), interfereinte 3/ácido cafeico (INT3/CAF), ácido cafeico/ácido siríngico (CAF/SIR), ácido siríngico/ácido *p*-cumárico (SIR/CUM), ácido *p*-cumárico/ácido ferrúlico (CUM/FERR), ácido ferrúlico/ácido 3,4-dicafeoilquínico (FERR/3,4DQ), ácido 3,4-dicafeoilquínico/3,5-dicafeoilquínico (3,4DQ/3,5DQ), 3,5-dicafeoilquínico /rutina, (3,4DQ/RUT), rutina/ácido 4,5-dicafeoilquínico (RUT/4,5DQ), ácido 4,5-dicafeoilquínico/interferente 4 (INT4/4,5DQ) e o valor das 14 simetrias referente a cada um dos picos nas diferentes condições experimentais. A **Tabela 2** sumariza os resultados obtidos para as repostas resolução e simetria da amostra adicionada de padrão.

Foram construídos modelos lineares, quadráticos e cúbicos para cada uma das respostas. O modelo mais simples que apresentou ajuste adequado foi utilizado para realizar a predição das condições ótimas. Cada modelo foi validado através da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. A **Tabela 3** mostra os coeficientes significativos utilizados em cada modelo e os resultados da ANOVA para os mesmos, empregando as respostas resolução (RS) e simetria.

Dentre os modelos testados para a resposta simetria, os picos INT1 e INT4 apresentaram falta de ajuste ($F_{faj} > F_{crítico}$), porém, estes também apresentaram regressão não significativa, assim como o ácido gálico (GAL), rutina (RUT) e ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5DQ) ($F_{reg} < F_{crítico}$), em um nível de 95% de confiança. Uma regressão não significativa denota que nenhuma das variáveis, nos níveis investigados, exerceu influência sobre o comportamento do sistema estudado. Para a resolução, apenas os picos 4,5DQ/INT4 apresentaram falta de ajuste ($F_{faj} > F_{crítico}$), em um nível de 95% de confiança.

Tabela 2. Respostas do planejamento composto central para as variáveis concentração inicial e final de gradiente e tempo de programação de gradiente.

<i>ENSAIO</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>PICO</i>	Resolução																	
GAL/INT1	12,77	7,22	12,64	7,03	13,04	6,94	12,83	7,24	15,79	5,34	9,31	9,09	9,17	9,05	8,63	9,09	9,20	9,58
INT2/5CQ	21,23	14,61	20,07	13,67	22,36	14,37	21,43	14,48	23,19	11,74	18,46	17,37	17,10	18,27	17,63	18,01	16,71	17,87
5CQ/INT3	5,73	4,82	5,47	4,49	5,09	4,89	5,41	4,78	5,23	4,58	5,75	5,02	4,86	5,71	5,34	5,43	5,12	5,43
INT3/CAF	5,24	6,44	5,85	6,00	4,24	6,45	4,85	6,40	4,15	6,33	6,26	6,17	6,07	6,33	6,43	6,55	6,19	6,52
CAF/SIR	5,47	4,05	4,71	3,39	6,88	4,25	5,68	4,02	6,22	3,09	5,39	4,36	4,33	5,32	4,93	4,82	4,69	4,75
SIR/CUM	19,62	20,22	18,59	18,86	20,21	19,97	19,77	19,70	19,45	18,86	20,49	19,10	19,35	20,30	19,61	19,25	18,86	19,18
CUM/FER	7,58	6,74	6,21	5,65	9,29	7,78	7,99	6,82	8,11	6,03	8,47	6,55	5,96	8,28	7,41	7,38	7,36	7,32
FER/3,4DQ	18,16	17,94	12,39	12,74	25,34	24,17	19,67	18,43	19,09	16,87	24,58	14,97	12,50	23,60	18,90	19,03	19,18	19,04
3,4DQ/3,5DQ	1,61	1,56	1,47	1,41	1,83	1,72	1,65	1,56	1,63	1,50	1,78	1,49	1,46	1,75	1,61	1,63	1,60	1,61
3,5DQ/RUT	7,38	7,26	7,85	7,32	6,91	6,41	7,23	7,08	7,37	6,76	6,82	7,56	7,71	6,88	7,19	7,43	6,99	7,33
RUT/4,5DQ	11,52	13,83	8,63	9,27	16,43	17,69	12,30	13,42	11,57	12,94	17,16	10,53	9,21	16,37	12,69	13,18	12,58	13,07
4,5/INT4	7,15	7,57	8,37	7,72	7,04	6,26	7,82	7,15	7,27	7,16	6,78	7,56	8,60	6,75	7,75	7,70	7,67	7,52
<i>PICO</i>	Simetria																	
GAL	0,43	0,49	0,43	0,50	0,42	0,50	0,42	0,49	0,44	0,47	0,51	0,52	0,52	0,55	0,56	0,52	0,42	0,42
INT1	0,70	0,72	0,72	0,65	0,70	0,63	0,70	0,68	0,74	0,67	0,69	0,69	0,71	0,70	0,69	0,69	0,69	0,69
INT3	0,55	0,52	0,57	0,50	0,54	0,48	0,56	0,49	0,58	0,48	0,52	0,52	0,53	0,51	0,51	0,52	0,49	0,52
5CQ	0,67	0,52	0,69	0,52	0,63	0,52	0,66	0,52	0,68	0,47	0,58	0,61	0,62	0,58	0,57	0,60	0,48	0,60
INT3	0,73	1,33	0,84	1,34	0,40	1,18	0,68	1,30	0,52	1,39	0,70	0,97	1,20	0,69	0,81	0,78	0,82	0,75
CAF	0,76	0,72	0,81	0,67	0,80	0,71	0,78	0,72	0,78	0,66	0,72	0,73	0,80	0,72	0,76	0,77	0,73	0,76
SIR	0,85	0,79	0,80	0,72	0,84	0,72	0,82	0,74	0,83	0,74	0,82	0,76	0,81	0,82	0,77	0,75	0,73	0,75
CUM	0,81	0,80	0,80	0,78	0,85	0,79	0,82	0,78	0,81	0,77	0,84	0,81	0,78	0,83	0,81	0,80	0,78	0,80
FER	0,86	0,81	0,83	0,80	0,84	0,84	0,87	0,81	0,85	0,79	0,86	0,84	0,82	0,85	0,84	0,84	0,82	0,84
3,4DQ	0,83	0,77	0,89	0,90	0,80	0,78	0,82	0,84	0,83	0,77	0,80	0,86	0,88	0,78	0,78	0,79	0,78	0,80
3,5DQ	0,67	0,61	0,67	0,61	0,67	0,60	0,67	0,61	0,68	0,57	0,65	0,63	0,66	0,63	0,64	0,65	0,65	0,65
RUT	0,69	0,80	0,74	0,72	0,84	0,85	0,71	0,75	0,68	0,69	0,85	0,76	0,72	0,82	0,70	0,79	0,70	0,80
4,5DQ	0,70	0,69	0,73	0,71	0,75	0,73	0,71	0,70	0,71	0,66	0,74	0,69	0,71	0,70	0,69	0,71	0,70	0,70
INT4	0,68	0,92	0,84	0,84	0,85	0,87	1,01	0,87	0,66	0,86	0,85	0,70	0,88	0,86	0,95	0,95	0,95	0,95

Os nomes completos das respostas estão descritos no texto.

Tabela 3. Coeficientes significativos para os modelos matemáticos construídos empregando-se a resolução entre pares de compostos e simetria como resposta e valores para a significância estatística da falta de ajuste dos modelos e da regressão.

Respostas	Coeficientes									Falta de ajuste	Regressão
	A	B	C	A ²	B ²	C ²	AB	AC	BC	F Valor	F Valor
GAL/INT1	-2,96	-	-	0,58	-	-	-	-	-	0,77	106,93
INT2/5CQ	-3,46	-0,35	0,37	-	-	-	-	-	-	0,083	127,92
5CQ/INT3	-0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	4,96	4,96
INT3/CAF	0,64	-	-	-0,45	-	-	-0,21	0,30	-	2,95	17,42
CAF/SIR	-0,90	-0,34	0,36	-	-	-	0,13	-0,19	-	2,93	71,20
SIR/CUM	-	-0,40	0,29	-	0,20	0,21	-	-	0,21	0,50	8,29
CUM/FER	-0,55	-0,58	0,70	-0,09	-0,05	-0,08	0,07	-0,16	-	5,53	282,59
FER/3,4DQ	-0,44	-2,82	3,30	-0,37	0,27	-0,34	-	-0,32	-	8,31	197,95
3,4DQ/3,5DQ	-0,03	-0,08	0,08	-0,01	0,008	-	-	-0,01	-	0,47	46,31
3,5DQ/RUT	-0,17	0,20	-0,26	-	-	-	-	-	-	0,43	31,61
RUT/4,5DQ	0,56	-1,98	2,10	-0,24	0,32	-	-	-	-	1,31	133,62
4,5/INT4	-	0,32	-0,41	-	-	-	-	-	-	12,99	12,87
GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36	0,53
INT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53,52	1,75
INT2	-0,03	-	-0,007	-	-	-	-	-	-	0,22	15,32
5CQ	0,068	-	-	-	-	-	-	-	-	0,018	6,74
INT3	0,29	0,07	-0,11	0,07	-	0,06	-	-	-	7,46	36,78
CAF	-0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	2,45	9,02
SIR	-0,03	-0,01	-	-	-	0,02	-	-	-	1,37	8,24
CUM	-0,01	-	0,009	-	-	-	-	-	-	1,00	6,18
FER	-0,01	-	0,009	-	-	-	-	-	-	3,03	5,65
3,4DQ	-	0,02	-0,02	-	0,01	0,01	-	-	-0,01	5,48	10,16
3,5DQ	-0,03	-	-	-0,007	-	-	-	-	-	1,49	31,01
RUT	-	-0,03	0,02	-	-	-	-	-	-	0,33	3,24
4,5DQ	-0,01	-	-	-	0,01	-	-	-	-	5,26	3,26
INT4	-	-	-	-0,05	-	-	-	-	-	1186,4	2,14

A: %inicial de metanol, B: %final de metanol e C: tempo de gradiente.

Ácido gálico = GAL; Interferente 1 = INT1; INT2 = Interferente 2; 5CQ = ácido 5-cafeoilquínico; Interferente 3 = INT3; ácido cafeico = CAF; ácido siríngico = SIR; ácido *p*-cumárico = CUM; ácido ferrúlico = FER; ácido 3,4, dicafeoilquínico = 3,4DQ; ácido 3,5-dicafeoilquínico = 3,4DQ; rutina = RUT; ácido 4,5-dicafeoilquínico = 4,5DQ; Interferente 4 = INT4. Compostos separados por barras (/) indicam a resposta resolução entre picos.

F_{crítico} (5,3,95%) para a falta de ajuste do modelo quadrático = 9,01

F_{crítico} (11,3,95%) para a falta de ajuste do modelo linear = 8,79

F_{crítico} (8,3,95%) para a falta de ajuste do modelo linear modificado = 8,85

F_{crítico} (9,8,95%) para a significância da regressão do modelo quadrático = 3,39

F_{crítico} (3,14,95%) para a significância da regressão do modelo linear = 3,34

F_{crítico} (6,11,95%) para a significância da regressão do modelo linear modificado = 3,04

Quando um modelo utilizado para a otimização dos algoritmos apresenta falta de ajuste, a função de desejabilidade de Derringer e Suich pode não estimar corretamente a condição ótima. Contudo, é possível afirmar que a falta de ajuste para a resposta 4,5DQ/INT4 foi pequena, com um valor de F ligeiramente superior ao valor de F crítico. Outro ponto a ser ressaltado, através da análise dos gráficos de diagnósticos do modelo, é que os resíduos apresentaram distribuição normal, sem indícios de heterocedasticidade, bem como uma boa relação entre os valores observados vs preditos, expressa pelos gráficos das Figuras 2 e 3. Além disso, a MQ_{ep} (média quadrática devido ao erro puro) resultou bem inferior para esta resposta, quando comparada com as demais. Com isso, o valor do quociente MQ_{faj}/MQ_{ep} (média quadrática devido à falta de ajuste/média quadrática devido ao erro puro, que representa o valor de F) pode ter resultado artificialmente maior, sendo possível atribuir a falta de ajuste observada ao valor subestimado da MQ_{ep} . Em função disso, o modelo gerado para a resolução 4,5DQ/INT4 foi utilizado para realizar a predição da condição ótima de separação através do método de Derringer e Suich.

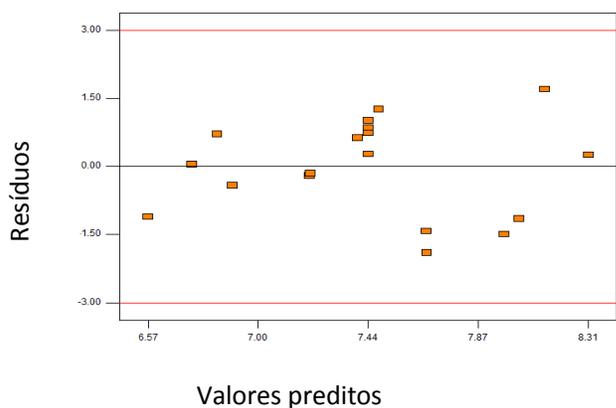


Figura 3. Gráfico de valores previstos VS observados para a resolução entre os pares de compostos 4,5DQ/INT4 que apresentou falta de ajuste.

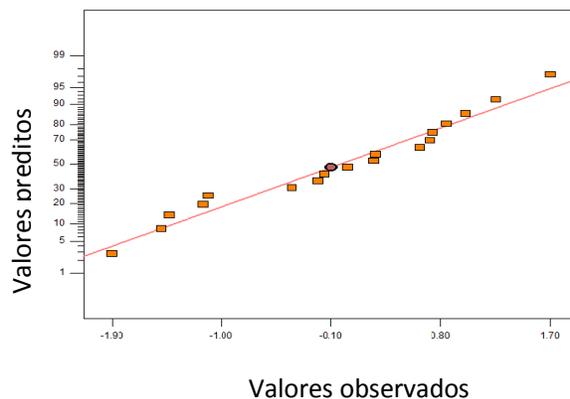


Figura 2. Gráfico da distribuição do resíduos para a resolução entre os pares de compostos 4,5DQ/INT4 que apresentou falta de ajuste.

De acordo com os resultados do planejamento e com a análise dos gráficos de contorno, todas as variáveis investigadas apresentaram algum efeito significativo, em um nível de 95% de confiança, sobre as respostas estudadas. Os resultados indicaram que o

aumento da concentração inicial de metanol causou redução da resolução entre os compostos, efeito ocasionado, provavelmente, pelo aumento da força cromatográfica inicial que acelerou a eluição dos compostos, promovendo uma menor interação entre estes e a fase estacionária e, portanto, menor retenção (LANÇAS, 2009). Este comportamento também foi verificado para a variável concentração final de metanol e pode ser explicado a partir dos ensaios 1 e 3. Fixando-se as variáveis porcentagem inicial de metanol e tempo de gradiente, para atingir a composição final de fase móvel que contém maior concentração de metanol (ensaio 3), a velocidade do programa de gradiente linear ($\%.\text{min}^{-1}$) precisa ser acelerada. Consequentemente, a força cromatográfica do sistema aumenta mais rapidamente, produzindo o mesmo efeito descrito para a variável concentração inicial de metanol (JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006; LANÇAS, 2009). No que se refere ao efeito do tempo de gradiente, os resultados indicaram que o aumento desta variável resultou no aumento da resolução, efeito desejado para a resolução entre os picos 3,4DQ/3,5DQ.

Foi observado que a elevação simultânea da concentração inicial e final de metanol resultou na redução da resolução entre CAF/SIR, CUM/FER, sendo constatado comportamento contrário para a resolução entre INT3/CAF. O efeito de interação entre a porcentagem inicial de metanol e o tempo de gradiente indicou que o emprego de maiores concentrações iniciais de metanol associado à redução do tempo resultou em redução da resolução entre os picos, efeito inverso observado apenas para INT3/CAF. Para a resposta em que se desejava obter maior resolução (3,4DQ/3,5DQ), os resultados apontaram que a resolução entre estes picos é aumentada conciliando-se menor porcentagem inicial e maior tempo de gradiente linear, o que pode ser explicado através de um raciocínio similar ao exposto para a variável concentração final de metanol. Mantendo-se fixa esta última variável, elevando-se o tempo de gradiente e reduzindo-se a porcentagem inicial de metanol simultaneamente, é possível afirmar que a velocidade do programa de gradiente linear ($\%.\text{min}^{-1}$) diminuiu. Em função disso, a taxa de progressão do gradiente ficou mais lenta, o que resultou em uma maior retenção e maior número de interações desses compostos com a fase estacionária, afetando positivamente a sua eficiência de separação (JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006; LANÇAS, 2009).

O efeito das variáveis estudadas sobre a simetria indicou que o emprego de maiores concentrações de metanol no início do gradiente resultou em picos com menor simetria. Os resultados mostraram ainda que o uso de uma porcentagem final de metanol mais elevado implicou em maior simetria para os picos 3,4DQ e SIR. No que concerne ao tempo de gradiente linear, foi constatado que a elevação do tempo de gradiente linear originou picos menos simétricos para o composto 3,4DQ, comportamento inverso verificado para os picos CUM e FER. Não houve efeitos de interação significativos para esta resposta.

3.3 Otimização simultânea das respostas resolução e simetria de compostos fenólicos através da técnica de Derringer e Suich

Ao usar a ferramenta Derringer e Suich, foram estabelecidas desejabilidades a fim de que os algoritmos utilizem os modelos gerados para maximizar a simetria de todos os picos e a resolução entre os picos 3,4DQ/3,5DQ e minimizar o tempo de corrida, sem prejudicar a separação entre os pares de picos restantes. Foram construídas funções de desejabilidade lineares unilaterais para maximização e minimização. Para a maximização da simetria dos picos e do par 3,4DQ/3,5DQ as equações foram:

$$d_i = 0 \text{ se } R_i < R_{\text{imin}}$$

$$d_i = \left(\frac{R_i - R_{\text{imin}}}{R_{\text{ialvo}} - R_{\text{imin}}} \right), \text{ se } R_{\text{imin}} \leq R_i \leq R_{\text{alvo}}$$

$$d_i = 1 \text{ se } R_i > R_{\text{alvo}}$$

Onde: d_i = desejabilidade i entre 0 e 1

R_i = valor previsto pelo modelo estatístico para as i resoluções ou simetria.

R_{ialvo} = valores máximos para a resolução ou simetria.

R_{imin} = valor mínimo para a resolução ou simetria.

Para da resolução entre os demais pares de picos, em que se desejava diminuir o tempo de corrida, sem prejudicar a sua separação, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$di = 0 \text{ se } Ri > Rmax$$

$$di = \left(\frac{Ri - Rmax}{Rialvo - Rimax} \right), \text{ se } Rimax \leq Ri \leq Ralvo$$

$$di = 1 \text{ se } Ri < Ralvo$$

Em que: di = desejabilidade i entre 0 e 1

Ri = valor previsto pelo modelo estatístico para a resolução i do pico.

$Rialvo$ = valores desejados para a resolução do pico.

$Rimax$ = valor máximo para a resolução do pico.

Os limites superiores e inferiores de desejabilidade para cada resposta otimizada foram estabelecidos após testes preliminares no programa estatístico, em que foram realizadas simulações com diferentes valores de resolução e simetria desejados. A partir destes testes, foi verificada a incapacidade do programa em gerar soluções quando se propunham valores mínimos e máximos de resolução para a resposta 3,4DQ/3,5DQ acima de 2,0 e 3,0, respectivamente. A minimização da resolução entre os demais pares de picos também demonstrou ausência de soluções existentes quando os limites superiores propostos eram muito pequenos. Assim, as condições de desejabilidade utilizadas neste trabalho estão descritas na **Tabela 4**.

O algoritmo encontrou cinco condições que satisfaziam os critérios estabelecidos, mas todas elas apresentavam variações muito pequenas entre si. Sendo assim, a condição ótima de separação que permitiu a máxima resolução para os picos 3,4DQ/3,5DQ e o máximo valor de simetria para todos os picos, bem como a resolução entre os demais pares de compostos que permitiu um menor tempo de corrida, foi concentração inicial de metanol (% Inicial MetOH) no gradiente de 13,9%, concentração final de 40% (% final de MetOH) e tempo de gradiente linear de 39,4 minutos. Os valores das respostas previstos pelo método

de Derringer e Suich para as resoluções e simetrias apresentaram boa concordância com os valores obtidos experimentalmente, exceto para os modelos que não apresentaram ajuste ou regressão significativa, como pode ser observado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Condições de desejabilidade empregadas na otimização simultânea e respostas previstas pelo modelo e observadas experimentalmente para a simetria e a resolução.

Variável/Resposta	Objetivo	Limite inferior	Limite superior	Importância	Previsto	Observado
% Inicial MetOH	Na faixa	-1,68	1,68	1	-	-
% Final MetOH	Na faixa	-1,68	1,68	1	-	-
Tempo	Minimizar	-1,68	1,68	1	-	-
GAL/INT1	Minimizar	5	30	1	10,71	11,11
INT2/5CQ	Minimizar	5	30		20,13	20,61
5CQ/INT3	Minimizar	5	30	1	5,60	5,08
INT3/CAF	Minimizar	4	30	1	4,89	4,67
CAF/SIR	Minimizar	5	30	1	6,46	6,37
SIR/CUM	Minimizar	5	30	1	20,99	20,49
CUM/FER	Minimizar	5	30	1	9,67	9,83
FER/3,4DQ	Minimizar	5	30	1	29,38	31,27
3,4DQ/3,5DQ	Maximizar	1,9	3	1	1,94	1,97
3,5DQ/RUT	Minimizar	5	30	5	6,50	5,95
RUT/4,5DQ	Minimizar	5	30	1	20,31	19,79
4,5/INT4	Minimizar	5	30	1	6,29	5,57
GAL	Maximizar	0,4	1	1	0,48	0,46
INT1	Maximizar	0,4	1	3	0,69	0,69
INT2	Maximizar	0,4	1	3	0,52	0,53
5CQ	Maximizar	0,4	1	3	0,58	0,60
INT3	Maximizar	0,4	1	3	0,51	0,42
CAF	Maximizar	0,4	1	3	0,75	0,75
SIR	Maximizar	0,4	1	3	0,84	0,83
CUM	Maximizar	0,4	1	3	0,86	0,83
FER	Maximizar	0,4	1	3	0,83	0,87
3,4DQ	Maximizar	0,4	1	3	0,64	0,79
3,5DQ	Maximizar	0,4	1	3	0,98	0,65
RUT	Maximizar	0,4	1	3	0,79	0,85
4,5DQ	Maximizar	0,4	1	3	0,76	0,77
INT4	Maximizar	0,4	1	3	0,79	0,9

Ácido gálico = GAL; Interferente 1 = INT1; INT2 = Interferente 2; 5CQ = ácido 5-cafeoilquínico; Interferente 3 = INT3; ácido cafeico = CAF; ácido siríngico = SIR; ácido *p*-cumárico = CUM; ácido ferrúlico = FER; ácido 3,4-dicafeoilquínico = 3,4DQ; ácido 3,5-dicafeoilquínico = 3,5DQ; rutina = RUT; ácido 4,5-dicafeoilquínico = 4,5DQ; Interferente 4 = INT4. Compostos separados por barras (/) indicam a resposta resolução entre picos.

3.4 Validação do método cromatográfico

O método foi validado com as condições cromatográficas sugeridas pelo método de Derringer e Suich. Os resultados podem ser visualizados nas **Tabelas 5 e 6**.

Através da análise de variância, verificou-se que a regressão linear foi significativa nas faixas de concentração estudadas e que os modelos matemáticos não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$), mostrando-se apropriados para realizar as quantificações. A faixa de concentração de trabalho não abrangeu o limite de quantificação dos compostos como o primeiro ponto da curva, porém, para a avaliação da repetitividade e da precisão intermediária do método (**Tabela 6**), estes níveis de concentração foram considerados.

Os resultados indicaram que o método cromatográfico desenvolvido foi adequado para a determinação dos dez compostos fenólicos estudados, estando de acordo com as exigências de validação (IUPAC, 2002; RIBANI *et al.*, 2004; PASCHOAL *et al.*, 2008). A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico de uma amostra, da mesma adicionada de padrão e do mix de padrões nas condições finais do método, após todo o processo de otimização e validação.

Tabela 5. Limites de detecção e quantificação e linearidade do método cromatográfico desenvolvido para separação de 10 compostos fenólicos em erva-mate.

Compostos	Linearidade (mg.L ⁻¹)	R ²	Limite de detecção (mg.L ⁻¹)	Limite de quantificação (mg.L ⁻¹)
Ácido gálico	0,1-7	0,9992	0,003	0,015
Ácido 5-CQ	0,3-25	0,9991	0,0125	0,0625
Ácido cafeico	0,1-7	0,9989	0,0125	0,0625
Ácido siríngico	0,1-7	0,9994	0,025	0,125
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,1-7	0,9985	0,025	0,125
Ácido ferrúlico	0,1-7	0,9991	0,006	0,03
Ácido 3,4DQ	0,2-14	0,9983	0,006	0,03
Ácido 3,5DQ	0,5-35	0,9979	0,0125	0,0625
Rutina	0,1-7	0,9984	0,0125	0,0625
Ácido 4,5DQ	0,2-14	0,9983	0,006	0,03

R² = coeficiente de determinação. Ácido 5-CQ = ácido 5-cafeoilquínico; Ácido 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; Ácido 3,5DQ = ácido 3,5-dicafeoilquínico; Ácido 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Tabela 6. Valores de repetitividade e precisão intermediária para a validação do método de separação de 10 compostos fenólicos em erva-mate.

Compostos	Nível	Concentração (mg.L ⁻¹)	Área*		Tempo de retenção*		
			Repetitividade n=10	Precisão intermediária n=3	Tempo (min)**	Repetitividade n=10	Precisão intermediária n=3
Ácido gálico	1	0,015	21,29	17,47			
	2	4	0,57	0,77	2,87	0,22	1,03
	3	7	0,72	0,36			
Ácido 5-CQ	1	0,0625	19,21	9,87			
	2	12	0,56	0,94	8,92	0,33	0,81
	3	21	0,33	0,30			
Ácido cafeico	1	0,0625	4,52	17,99			
	2	4	0,50	0,78	11,18	0,20	0,89
	3	7	0,25	0,13			
Ácido siríngico	1	0,125	9,08	6,96			
	2	4	1,13	0,70	12,52	0,27	0,83
	3	7	0,56	0,16			
Ácido <i>p</i> -cumárico	1	0,125	12,86	8,44			
	2	4	0,44	0,74	17,18	0,17	0,80
	3	7	0,27	0,30			
Ácido ferrúlico	1	0,03	13,49	12,61			
	2	4	0,25	0,84	19,62	0,18	0,66
	3	7	0,36	0,28			
Ácido 3,4 DQ	1	0,03	12,19	8,7			
	2	8	0,62	1,02	26,92	0,53	0,85
	3	14	0,46	0,54			
Ácido 3,5-DQ	1	0,0625	12,26	20,68			
	2	20	0,21	0,59	27,29	0,68	0,59
	3	35	0,34	0,48			
Rutina	1	0,0625	19,32	18,41			
	2	4	1,08	1,88	28,75	0,19	0,36
	3	7	0,90	0,11			
Ácido 4,5-DQ	1	0,03	18,80	18,25			
	2	8	0,72	0,85	33,03	0,09	0,33
	3	14	0,28	0,20			

Ácido 5-CQ = ácido 5-cafeoilquínico; Ácido 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; Ácido 3,5DQ = ácido 3,5-dicafeoilquínico; Ácido 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico

*Os resultados para repetitividade e precisão intermediária estão expressos em valores de coeficiente de variação (CV).

** Os valores para o tempo de retenção representam a média de 10 injeções.

Nível 1 = limite de quantificação dos compostos

Nível 2 = ponto contemplando a região de concentração central da faixa linear

Nível 3 = ponto contemplando a região de concentração na extremidade superior da faixa linear.

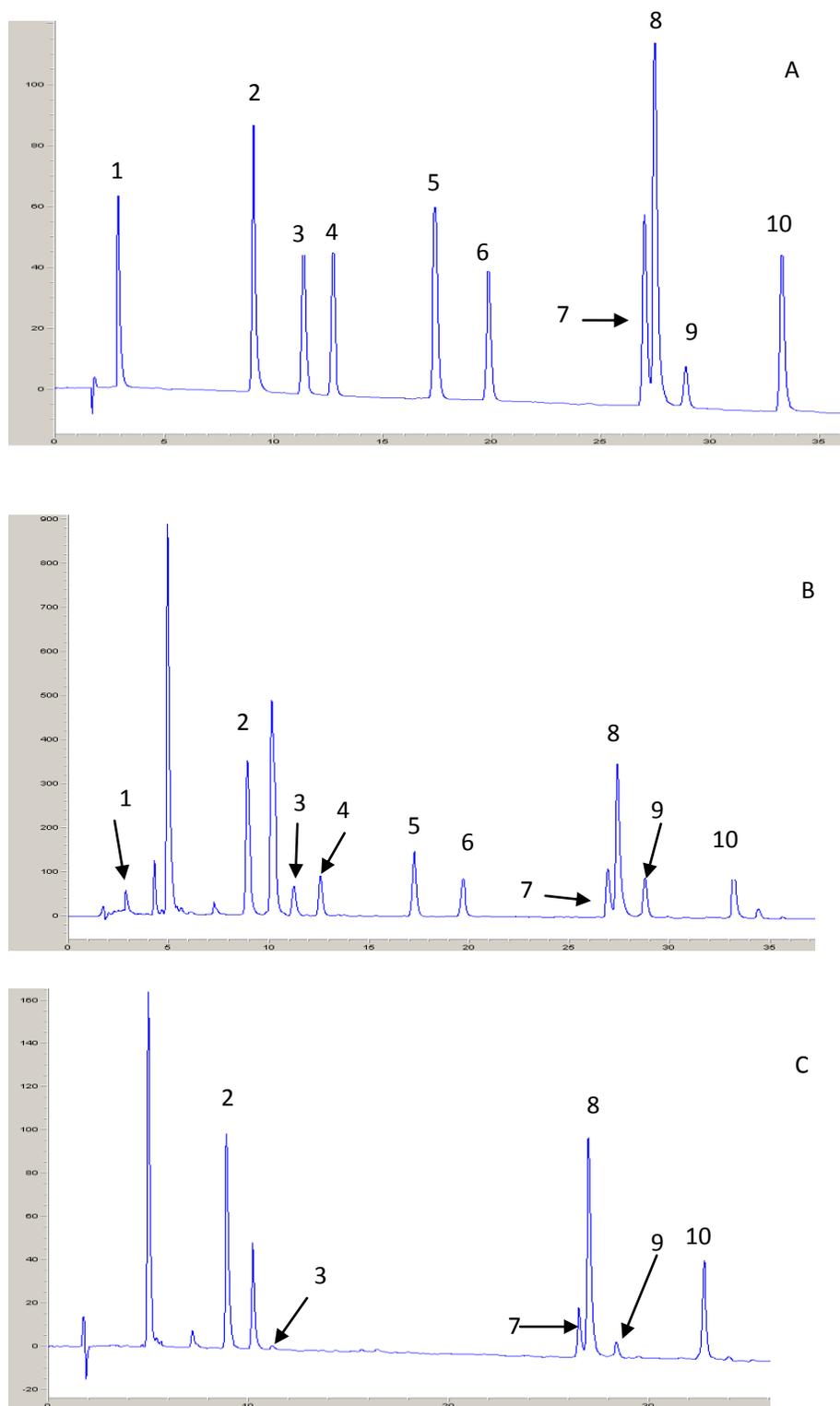


Figura 4. Perfis cromatográficos da solução padrão (A), amostra adicionada de padrão (B) e amostra (C) obtidos após a otimização e validação do método cromatográfico.

1)Ácido gálico; 2)Ácido 5-cafeoilquínico; 3) ácido cafeico; 4)Ácido siríngico; 5) Ácido *p*-cumárico; 6) ácido ferrúlico; 7) ácido 3,4-dicafeoilquínico; 8) ácido 3,5-dicafeoilquínico; 9) rutina; 10) ácido 4,5-dicafeoilquínico. As condições cromatográficas estão descritas no texto. Comprimento de onda = 280 nm.

4 CONCLUSÃO

As técnicas estatísticas multivariadas utilizadas neste trabalho demonstraram ser ferramentas eficientes para realizar a otimização de métodos de separação cromatográfica.

A otimização multivariada realizada em matriz alimentícia adicionada de padrão mostrou ser uma boa alternativa para garantir a aplicabilidade do método em amostra verdadeira. O estudo da validação apresentou resultados satisfatórios, concluindo-se que o método é adequado para a determinação dos 10 compostos fenólicos estudados em bebidas de erva-mate.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2012/12565-0), pelo auxílio financeiro à pesquisa e à CAPES pela concessão da bolsa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLUS, C.A. **Otimização da separação de compostos fenólicos por eletroforese capilar e análise da composição em ácidos graxos de azeite de oliva extravirgem.** 2010. 159p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. *Yerba mate*: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and aromatic planta science and biotechnology**, v. 1, n. 1, p.37-46, 2007.
- BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F.I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation

- of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p.1192-1202, 2009.
- BRACESCO, N. SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: **Minireview. Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.
- BREITKREITZ, M.C. **Otimização simultânea de variáveis de processo e mistura em cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de mestrado. 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439-1449, 2009.
- BIZZOTO, C.S.; MEINHART, A.D.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BALLUS, C.A.; GODOY, H.T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, p. 763-768, 2012.
- DIAS, C.B. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para determinação de edulcorantes por UPLC-PDA**. 2011. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- DIMITRIUS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in food science & technology**, v. 17, p. 505–512, 2006.

- FARAH, A. DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian journal of plant physiology**, v.18, n.1, p.23-36, 2006.
- FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BARROS NETO; B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.
- FILIP, R. LOPÉZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.774-778, 2001.
- HECK, C.I.; MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n.9, 2007.
- HECK, C.I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E.G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, p. 8394–8403, 2008.
- IUPAC TECHNICAL REPORT. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure applied chemistry**, v. 74, n. 4, p.835-855, 2002
- JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Org) **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. p.273-398.
- LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Editora da Unicamp, 2009. 382p.

- KALILI, K.M.; VILHERS, A. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of separation science**, v.34, p. 854-876, 2011.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370–1376, 2009.
- MEINHART, A.D.; BALLUS, C.A.; BRUNS, E.R.; PALLONE, J.A.; GODOY, H.T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v.85, n.1, p.237-244, 2011.
- PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.A.. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v.122, p.173-178, 2010.
- PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.5, p.1190-1198, 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p.200-207, 2002.
- SANLI, N.; FONRODONA, G.; BARRÓN, D. OSKAN, G.; BARBOSA, J. Prediction of chromatographic retention, pK values and optimization of the separation of

- polyphenolic acids in strawberries. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 299–309, 2002.
- TAPPIN, M.R.R.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1090-1095, 2008.
- TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v.1018, p.29-40, 2003.
- VALERGA, J.; RETA, M. LANARI, M.C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **Food Science and Technology**, v. 45, p. 28-35, 2012.
- WANG, Y.; HARRINSON, M.; CLARK, B.J. Optimising reversed-phase liquid chromatographic separation of an acidic mixture on a monolithic stationary phase with the aid of response surface methodology and experimental design. **Journal of Chromatography A**, v.1105, p. 199–207, 2006.
- ZIZANOVIC, L.; PROTIC, A.; ZECEVIC, M.; JOCIC, B.; KOSTIC, M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p.640-648, 2009.

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA SOBRE A
TRANSFERÊNCIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PREPARO DO
CHIMARRÃO”**

Tayse F.Ferreira da Silveira, Adriana D. Meihart, Thaís Cristina Lima de Souza, Elenice
Carla Emídio Cunha, Maria Rosa de Moraes e Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) é utilizada para o preparo do chimarrão, bebida resultante da infusão parcial das folhas e talos de erva-mate em água quente, largamente consumida na América Latina. A erva-mate contém altas concentrações de compostos fenólicos, principalmente ácidos clorogênicos e flavonoides, os quais têm sido associados à capacidade antioxidante e antimutagênica verificada em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. Embora a composição química da erva-mate seja bem estabelecida, nota-se que a literatura acerca do tema carece de estudos que descrevam a importância das bebidas preparadas a partir desta planta como fontes destes compostos, considerando suas peculiaridades de preparo, como tipo de infusão, tipo de erva-mate e temperatura da água de preparo. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura da água (65°C, 75°C, 85°C e 95°C) sobre a concentração dos compostos fenólicos (ácidos gálico, sirínico, cafeico, ferrúlico, *p*-cumárico, 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, e rutina) transferidos da erva-mate para os extratos aquosos de chimarrão preparados a partir de dois tipos comerciais de erva-mate: moída grossa e tradicional. Para tanto, o preparo do chimarrão foi conduzido simulando-se o modo como é tradicionalmente preparado pelo consumidor. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a um detector de arranjo de diodos. Dentre os compostos investigados, foi verificada a presença de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, rutina e ácido 4,5-dicafeoilquínico nos extratos aquosos de chimarrão. De acordo com os resultados, a variação da temperatura não afetou significativamente a transferência desses compostos para os extratos de chimarrão obtidos a partir da erva-mate tradicional. Já para a erva-mate moída grossa, constatou-se que o aumento dessa variável favoreceu a obtenção de extratos com maiores níveis desses compostos. Os extratos obtidos a partir da erva-mate moída grossa apresentaram teores mais elevados dos compostos do que os obtidos a partir da erva-mate tradicional. Os resultados demonstraram que o hábito de consumir chimarrão implica na ingestão diária de grandes volumes dessa bebida e, conseqüentemente, de elevados níveis de compostos fenólicos, em especial de ácidos clorogênicos. A partir dos resultados

obtidos é possível afirmar que o chimarrão constitui uma excelente fonte de compostos fenólicos para a dieta, principalmente de ácidos clorogênicos.

Palavras chave: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, infusão, ácidos clorogênicos.

ABSTRACT

Yerba mate is employed for preparing “chimarrao”, a traditional beverage largely consumed in Latin American, which consists in a partial infusion of the yerba mate in hot water. The most widespread way of consuming these beverages is characterized by repeated additions of water on the yerba mate, up to the loss of the taste being noticed by the consumer. Yerba mate presents high concentrations of phenolic compounds, mostly of chlorogenic acids and flavonoids, which have been associated, in various *in vivo* and *in vitro* studies, with antioxidant and antimutagenic activities. Though the chemical composition of yerba mate are well established, it is noted a lack of studies that describe the importance of the beverages prepared from this plant as a source of these phenolic compounds, considering the impact of their preparation peculiarities, such as type of infusion, type of yerba mate and temperature of the water on these compounds concentration. So, this study aimed to evaluate the impact of the water temperature (65°C, 75°C, 85°C and 95°C) upon the individual concentration of phenolic compounds (gallic acid, syringic acid, caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5- dicaffeoylquinc acid and rutin) transferred to the aqueous extracts of “chimarrao” prepared from two commercial types of yerba mate, traditional and coarse-ground. For this purpose, “chimarrao” was prepared simulating the way that it is traditionally made by the consumers. The aqueous extracts of “chimarrao” obtained were analyzed by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector. Among the compounds investigated, the presence of 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5- dicaffeoylquinc acid, caffeic acid and rutin was confirmed in the aqueous extract of “chimarrao”. According to the data, temperature variation did not affect significantly, at a 95% confidence level, the transference of these compounds to the aqueous extracts of chimarrao obtained from the traditional yerba mate. In relation to the course-ground yerba mate, it was found that the increase of this factor favored the obtention of chimarrao extracts with higher levels of the compounds. From the results of this work, it is possible to

assert that “chimarrao” is an excellent source of phenolic compounds for our diet, especially of chlorogenic acids.

Key words: *Ilex paraguariensis*, infusion, yerba mate, chlorogenic acids.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa da região subtropical da América do Sul. Suas folhas e talos secos e triturados são amplamente utilizados para o preparo de infusões muito apreciadas por suas características sensoriais e estimulantes, como o tererê, o chá mate e o chimarrão (HECK, MEJIA, 2007).

Nos últimos anos, o interesse sobre esta planta tem aumentado significativamente em função de diversos estudos que comprovaram, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, as propriedades benéficas à saúde humana oriundas do consumo de bebidas a base de erva-mate (BOAVENTURA *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que extratos aquosos de erva-mate apresentam propriedades vasorelaxantes, anti-inflamatória, anti-arterosclerótica, hipocolesterolêmica e capacidade antioxidante (BRACESCO *et al.*, 2003; STEIN *et al.*, 2005; ARÇARI *et al.*, 2009; DE MORAIS *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2012). Recentemente, em um ensaio conduzido por De Moraes e colaboradores (2009) em 102 humanos, com 15 indivíduos apresentando níveis normais de lipídios no sangue (normolipidêmicos), 57 com níveis acima do recomendado (dislipidêmicos) e 30 indivíduos portadores de hipercolesterolemia (elevados níveis de colesterol), foram fornecidas infusões a base de erva-mate (330 mL/3 vezes ao dia por 60 dias). Os resultados demonstraram que a ingestão das infusões promoveram decréscimo dos níveis de colesterol LDL e aumento da concentração do colesterol HDL sanguíneo em todos os grupos estudados. Além disso, foi observado que o consumo das infusões reduziu os níveis de colesterol não-HDL dos indivíduos portadores de hipercolesterolemia.

Algumas das propriedades biológicas apresentadas pelas bebidas a base de erva-mate são atribuídas a sua composição química rica em compostos fenólicos (BASTOS *et al.*, 2007). A composição fenólica das infusões apresenta altas concentrações de ácidos fenólicos, especialmente ácidos clorogênicos e seus isômeros mono e dicafeoilquínico (ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico). Além destes, já foram descritos os flavonoides quercetina, kaempferol e rutina, sendo este último o flavonoide presente em maior abundância (FILIP *et al.*, 2001; BRAVO, GOYA, LECUMBERI, 2008; MARQUES, FARAH, 2009). Estudos *ex vivo*

demonstraram que os ácidos clorogênicos auxiliam na proteção do colesterol LDL contra oxidação (GUGLIUCCI, 1996). Foi demonstrado ainda, através de ensaios *in vitro*, que estes compostos são responsáveis pela inibição do fenômeno da glicação, a qual pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e complicações vasculares em indivíduos portadores de diabetes (GUGLIUCCI, BASTOS, SCHULZE, 2009). A rutina, além de apresentar capacidade antioxidante e antiinflamatória (SHENBAGAM & NALINI, 2010; KAZLOWSCA *et al.*, 2009), tem se destacado por sua eficiência no tratamento de doenças vasculares, como observado em alguns estudos realizados em humanos (UNKAUF *et al.*, 1996; VANSCHIEDT *et al.*, 2002; ERLUND, 2004).

O chimarrão, bebida resultante da infusão parcial da erva-mate em água quente, constitui a forma de consumo mais difundida da planta. Na América do Sul, cerca de 30% da população consome mais de um litro de chimarrão por dia (FILIP, 2001). Tradicionalmente, o preparo do chimarrão consiste em dispor verticalmente uma quantidade de erva contra a parede de um recipiente denominado “cuia”, de modo que a erva ocupe cerca de 2/3 do volume do mesmo. O espaço remanescente na cuia é então preenchido com a água quente, a qual é succionada com o auxílio da “bomba”, espécie de canudo metálico contendo um disco perfurado na extremidade. O preparo do chimarrão caracteriza-se pela sucessiva adição de água na cuia, de forma a obter várias infusões preparadas a partir de uma mesma erva disposta na cuia. Em geral, novas alíquotas de água são adicionadas até que o consumidor note perda do sabor da infusão (MEINHART *et al.* 2010).

As ervas-mate mais consumidas para o preparo do chimarrão são a tradicional e a moída grossa. A primeira consiste em uma mistura de folhas e talos de erva proveniente de herbais nativos e cultivados, geralmente na proporção 50/50, enquanto a segunda caracteriza-se por apresentar uma mistura similar de plantas nativas e cultivadas, porém com um tamanho de moagem maior (BIZZOTO *et al.*, 2012).

Embora o perfil de compostos fenólicos da erva-mate esteja bem estabelecido, existem poucos trabalhos na literatura que tenham investigado os níveis ingeridos desses compostos a partir do consumo de infusões a base de erva-mate. Com relação ao chimarrão,

Meinhart e colaboradores (2010) quantificaram o teor de compostos fenólicos totais nas bebidas obtidas a partir das ervas-mate tradicional e moída grossa, preparadas da forma tradicionalmente realizada pelo consumidor. Os autores constataram que o teor de compostos fenólicos totais ingeridos em 100 mL de chimarrão (primeiro extrato dentre 30) foi de 225 mg para os extratos aquosos de erva-mate moída grossa e 235 mg para aqueles obtidos a partir da erva-mate tradicional. Bastos e colaboradores (2005) e Mazzafera (1996) simularam em laboratório o preparo do chimarrão, realizando 2 adições de água sobre a erva. Os extratos obtidos foram somados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com os resultados, os autores estimaram que uma cuia de 500 mL de chimarrão pode conter de 226 a 240 mg de ácido 5-cafeoilquínico.

Os níveis de compostos fenólicos ingeridos a partir do consumo do chimarrão podem variar em função do tipo e quantidade de erva empregada, da proporção de água adicionada em relação à quantidade de erva, do tamanho da cuia utilizada, do número de infusões preparadas com a mesma erva, da composição da mesma em folhas e galhos e da temperatura de preparo. Embora não exista uma temperatura estabelecida para o preparo da bebida, em geral, o chimarrão é preparado com água entre 75°C e 85°C (MAZZAFERA, 1996; MEINHART *et al.*, 2010; MURAKAMI *et al.*, 2010). O efeito das distintas formas de preparo sobre a composição química da bebida ingerida pelo consumidor é de elevada importância já que as propriedades benéficas associadas ao consumo destas bebidas podem ser correlacionadas diretamente aos componentes extraídos das folhas (ASTILL *et al.* 2001; NISHIYAMA *et al.*, 2010). Entretanto, dentre a literatura pesquisada, não foram encontrados trabalhos publicados que tenham investigado o efeito da temperatura da água de preparo de chimarrão sobre a concentração individual dos compostos fenólicos presentes na bebida pronta para consumo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura da água sobre a concentração individual dos compostos fenólicos transferidos da erva-mate para os extratos aquosos durante o preparo do chimarrão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de erva-mate

Amostras de erva-mate tradicional e moída grossa foram fornecidas nas embalagens comumente utilizadas para a comercialização por uma ervateira localizada no Rio Grande do Sul. Na **Tabela 1** estão descritas as características das ervas adquiridas, conforme informado pela empresa fabricante.

Tabela 1. Composição das ervas-mate utilizadas nos experimentos

Composição	Tradicional	Moída grossa
Folhas de plantas nativas	70%	60%
Folhas de plantas cultivadas	30%	40%
Talos/Galhos	27%	26%

2.2 Preparo do chimarrão

O preparo do chimarrão utilizando-se as ervas-mate tradicional e moída grossa foi efetuado simulando-se a forma como é usualmente realizado pelo consumidor (MEINHART *et al.*, 2010). Procedeu-se da seguinte forma: 85 g de erva-mate foram verticalmente dispostos em uma cuia de tamanho médio (aproximadamente 250 mL), ocupando cerca de 2/3 do volume da mesma, conforme as instruções de preparo da bebida presentes no rótulo. Em seguida, aferiu-se 150 mL de água em uma proveta e transferiu-se o volume para o espaço remanescente da cuia. O volume de água adicionado foi registrado.

2.3 Obtenção dos extratos aquosos de chimarrão e variação da temperatura da água de infusão

Para a extração dos extratos aquosos de chimarrão, foi utilizado um sistema como o ilustrado na Figura 1, composto por uma bomba de vácuo acoplada a um kitassato de 1000 mL, o qual, por sua vez, foi conectado através de uma mangueira de borracha à bomba utilizada para a sucção do chimarrão. A bomba permaneceu imersa dentro da cuia em uma posição fixa durante toda a extração. Os extratos foram obtidos da seguinte maneira: após a adição da água na cuia, a erva-mate permaneceu em infusão parcial por 30 segundos, período após o qual o extrato resultante foi imediatamente succionado para o kitassato e recolhido. Após um intervalo de 2 minutos, a cuia foi novamente completada com água e o procedimento de extração foi repetido. A cuia foi completada com água mais 29 vezes, totalizando 30 extratos aquosos de chimarrão. Para ambos os tipos de erva-mate estudados, foram obtidos extratos aquosos preparados com água a 65°C, 75°C, 85°C e 95°C.

Este método de extração representa 30 extratos aquosos de chimarrão ingeridos sucessivamente pelos consumidores, ao final dos quais a bebida perde sabor e a erva é descartada. Dos 30 extratos recolhidos, foram analisados os extratos 1 a 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, de acordo com Meinhart e colaboradores (2010), sendo os demais extratos descartados.

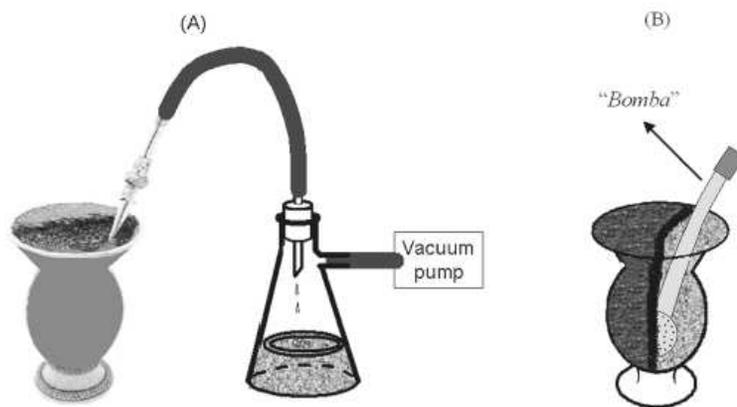


Figura 1. (A) Obtenção dos extratos aquosos de chimarrão. (B) visão interna da cuia de chimarrão com a erva-mate já disposta

O preparo das bebidas foi conduzido sempre em triplicata. Durante a realização dos experimentos, a disposição vertical da erva-mate na cuia não foi alterada, pois isso causaria uma grande variação no teor dos compostos fenólicos.

Uma vez recolhido, cada extrato foi filtrado com papel de filtro comum, adequadamente diluído, centrifugado a 7000 rpm e o sobrenadante foi novamente filtrado através de filtro Milex (Millipore) de porosidade 0,22 μm , transferido para eppendorff e levado ao freezer a -18°C , ao abrigo da luz, até o momento da análise.

2.4 Quantificação do teor compostos fenólicos presentes na erva-mate

Para avaliar o quanto a infusão parcial consegue extrair em relação ao conteúdo total dos compostos fenólicos presentes na erva-mate, esta foi submetida a um processo de extração exaustiva. A extração foi realizada conforme Meinhart e colaboradores (2010), com algumas modificações. Antes de serem submetidas à extração, as ervas foram moídas para uma granulometria de 100 mesh. Foram adicionados 10 mL de metanol em 2 g de erva-mate. Esta mistura foi submetida a agitação mecânica por 3 horas, período após o qual foi centrifugada por 10 minutos a uma velocidade de 3500 g. O sobrenadante foi separado e ao conteúdo sólido remanescente foi adicionado mais 10 mL de metanol. A mistura permaneceu por mais uma hora sob agitação e, ao final, foi novamente centrifugada. Os extratos metanólicos provenientes das duas etapas de extração foram unidos em balão volumétrico de 25 mL e aferidos com metanol. Os extratos foram então filtrados com Milex (Millipore) 0,22 μm , adequadamente diluídos com água Milli-Q (Millipore) e submetidos a análise cromatográfica. A quantificação dos compostos presentes nestes extratos foi realizada através do mesmo método aplicado em extratos aquosos.

2.4 Instrumentação e condições cromatográficas

A separação dos compostos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo Agilent 1100, equipado com um sistema quaternário de bombas, injetor automático e detector de arranjo de diodos, todos da Hewlett Packard série 1100. Para realizar a separação foi empregada uma coluna de fase reversa C18, com 100 mm X 4,6 mm e 3 μm de tamanho de partícula.

A análise cromatográfica consistiu em um sistema de eluição em gradiente linear, com a fase móvel constituída de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (A)/metanol (B). O gradiente linear foi programado da seguinte forma: 13,9% de B a 40% de B em 39,4 minutos. A detecção foi feita a 325 nm (para os ácidos clorogênicos e derivados do ácido hidroxicinâmico) e 280 nm (para os derivados do ácido hidroxibenzóico). O fluxo da fase móvel foi mantido em 0,8 mL.min⁻¹, o volume de injeção foi 30 μL e a temperatura do forno da coluna foi fixada em 30 °C. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por co-cromatografia e através da comparação entre o tempo de retenção e o espectro de absorção dos picos obtidos através da análise cromatográfica dos extratos aquosos de erva-mate com aqueles obtidos para os padrões analíticos. A quantificação foi realizada através de padronização externa, utilizando-se os referidos padrões puros na construção de curvas analíticas, e os resultados expressos em mg.100 mL⁻¹ de chimarrão e em mg.g⁻¹ de erva-mate. Os picos cromatográficos foram registrados e integrados com o auxílio do *software* Agilent Chemstation.

2.6 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados obtidos após a análise dos extratos aquosos de chimarrão foram submetidos ao teste de Tukey, sendo consideradas estatisticamente diferentes as amostras que apresentaram $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o auxílio do *software* Statistitica 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição fenólica dos extratos aquosos de chimarrão

No presente estudo foi verificada a presença do ácido 5-cafeoilquínico (5CQ), do ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4DQ), do ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5DQ), do ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5DQ), do ácido cafeico (CAF) e do flavonoide rutina (RUT) nos extratos aquosos de chimarrão, resultado que está de acordo com a literatura sobre o tema (MAZZAFERA, 1996; FILIP *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2005; RIBANI, 2006; MARQUES & FARAH, 2009). O perfil cromatográfico do extrato aquoso do chimarrão pode ser visualizado Figura 1.

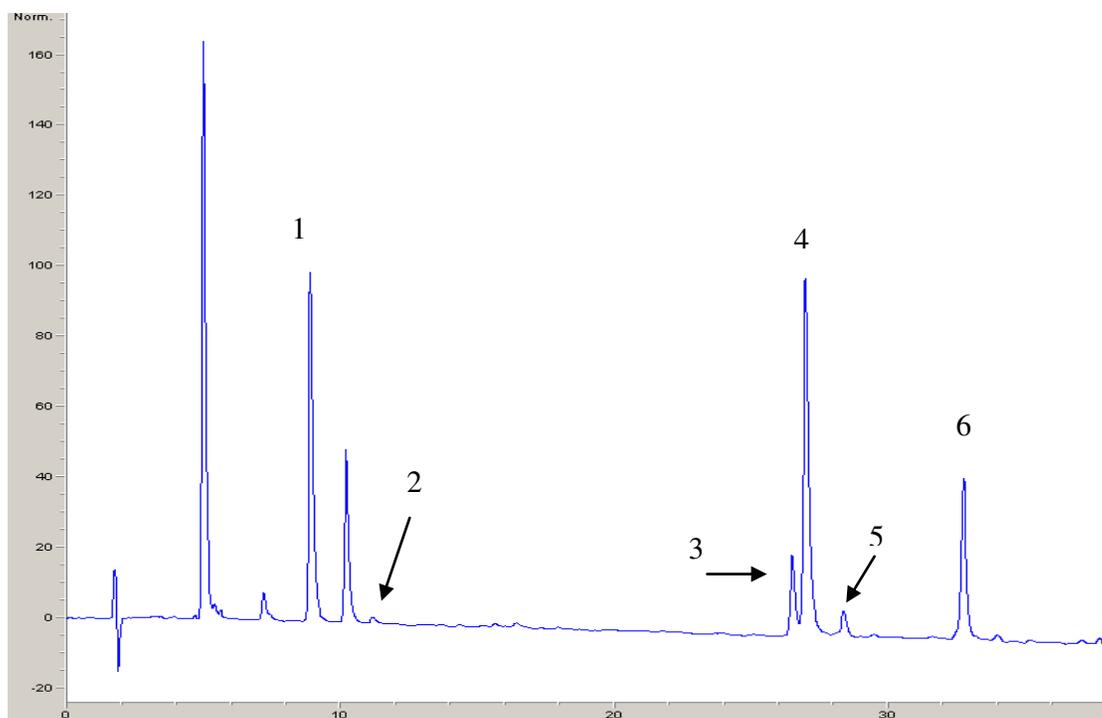


Figura 1. Perfil cromatográfico de um extrato aquoso de chimarrão. 1) ácido 5-cafeoilquínico 2) ácido cafeico 3) ácido 3,4-dicafeoilquínico 4) ácido 3,5-dicafeoilquínico 5) rutina 6) ácido 4,5-dicafeoilquínico. Detecção a 325 nm. As condições cromatográficas estão descritas no texto.

3.2 Efeito da temperatura da água de infusão sobre a concentração de compostos fenólicos durante o preparo do chimarrão

Nas **Tabelas 2 e 3** estão apresentadas as concentrações dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos de chimarrão preparados nas condições de temperatura estudadas. Os valores representam os níveis de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, rutina e ácido 4,5-dicafeoilquínico que seriam normalmente ingeridos por um consumidor de chimarrão. O volume de extrato aquoso extraído para as diferentes temperaturas foi, em média, $95,0 \pm 6,7$ mL para a erva-mate tradicional e $75 \pm 5,7$ mL para a moída grossa. Todos os compostos estavam presentes nos extratos aquosos em concentrações quantificáveis até o trigésimo extrato.

De acordo com tratamento estatístico dos dados obtidos para a erva-mate moída grossa, os extratos de chimarrão preparados com água a 65°C , 75°C e 85°C não apresentaram diferença significativa, em um nível de 95% de confiança, quanto ao teor dos compostos fenólicos analisados, diferindo, no entanto, dos extratos obtidos a 95°C . Foi verificado que o preparo do chimarrão nesta temperatura resultou em uma bebida com os maiores teores dos compostos fenólicos.

Os ácidos clorogênicos, principais constituintes encontrados nos extratos aquosos do chimarrão, são altamente solúveis em água quente e relativamente estáveis quando expostos a temperaturas de água em ebulição por curtos períodos de tempo (até 5 minutos), como já demonstrado por de Maria e colaboradores (1998), Farah e Donangelo (2006) e Dawidowicz e Typek (2010). Além disso, o aumento da temperatura eleva a solubilidade dos compostos fenólicos, promovendo maiores níveis de extração (CACACE, MAZZA, 2003). A associação desses fatores, pode explicar o acréscimo dos teores dos ácidos 5CQ, ácido cafeico, 3,4DQ, 3,5DQ, 4,5DQ e da rutina nos extratos de chimarrão preparados a partir da erva-mate moída grossa a 95°C .

No que se refere à erva-mate tradicional, foi observado que a temperatura não afetou significativamente ($p > 0,05$) a transferência dos compostos fenólicos estudados, em um nível de 95% de confiança. A ocorrência de extratos que eventualmente resultaram em teores significativamente diferentes ($p < 0,05$) foi atribuída a erros aleatórios devido às

características intrínsecas do preparo do chimarrão, que refletiram no processo de extração. Durante a condução dos experimentos foi inevitável, não obstante toda a atenção dispensada para esta etapa da extração, que uma pequena porção de erva-mate se desprendesse do montante disposto contra a parede da cuia, entrando em infusão completa. Não foi possível controlar esta quantidade, sendo provável que tenham havido diferenças entre algumas replicatas de um mesmo ponto extração no que se refere à quantidade de erva em infusão total.

Uma possível justificativa para esta divergência no comportamento da transferência de compostos das ervas-mate para a água de infusão mediante a variação da temperatura, repousa na diferença do nível de compactação alcançado pelas mesmas durante o preparo do chimarrão. Ainda que sejam dispostas contra a parede da cuia da mesma forma, a erva-mate moída grossa sofre uma menor compactação devido ao tamanho de partícula mais elevado, que não permite a acomodação perfeita entre as partículas da erva. Já para a erva-mate tradicional, por ser constituída de partículas mais finas, observou-se o comportamento contrário, e um maior empacotamento das partículas foi atingido. Em função dessa característica, a permeabilidade da água na erva-mate moída grossa é maior em relação a erva-mate tradicional. Essa particularidade é evidenciada quando são comparados os volumes de extrato extraído a partir da erva moída grossa, que foram 25% menores em relação aos extratos de chimarrão obtidos a partir da erva-mate tradicional. Assim, a maior penetração da água na erva-mate moída grossa, durante o preparo do chimarrão, permite um maior contato da água de infusão com as folhas e galhos, favorecendo assim a extração dos compostos.

De acordo com a **Tabela 2**, quando comparadas as concentrações obtidas dos compostos entre a menor e a maior temperatura estudada (65 e 95°C), observou-se que o primeiro extrato obtido a 95°C, que representa o primeiro extrato de chimarrão ingerido por um consumidor comum após a disposição da erva na cuia, apresentou um aumento de 51% no teor de ácido 5CQ. Nos extratos preparados na sequência, este aumento foi, em média, de 56%. Houve um acréscimo significativo também para o ácido cafeico, o qual apresentou concentração 88% maior no primeiro extrato e uma média de 92% a mais nos extratos seguintes. Em relação ao extrato 1 obtido a 65°C, o mesmo obtido a 95°C teve sua

concentração de ácido 3,4DQ dobrada, enquanto a elevação média do teor desse composto nos demais extratos foi de 57%. Para o ácido 3,5DQ, o primeiro extrato apresentou um teor 64% maior e o ganho médio nos extratos subsequentes foi de 60%. Já para a rutina, o aumento médio obtido pelos extratos preparados a 95°C foi de 75%, sendo que no primeiro extrato o teor de rutina foi 70% maior. O ácido 4,5DQ teve um acréscimo de concentração médio de 55%, destacando-se que no extrato 2 a concentração foi duas vezes maior, e no extrato 1 foi 53% maior.

Tabela 2. Concentrações de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de chimarrão preparado a partir da erva-mate moída grossa.

Extrato	Ácido 5-cafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)				Ácido cafeico (mg.100 mL ⁻¹)				Ácido 3,4-dicafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)			
	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C
1	33,55±6,44 ^{aA}	26,88±4,36 ^{aA}	40,63±8,53 ^a	50,10±3,13 ^{aB}	0,17±0,05 ^{aA}	0,15±0,03 ^{aA}	0,24±0,02 ^a	0,32±0,04 ^{aB}	4,30±1,21 ^a	4,29±0,78 ^a	5,29±1,03 ^a	8,17±0,28 ^b
2	25,81±7,17 ^{aA}	22,43±4,30 ^{aA}	33,71±6,26 ^a	48,24±12,80 ^{aB}	0,11±0,02 ^{aA}	0,14±0,05 ^{aA}	0,21±0,01 ^a	0,32±0,12 ^{aB}	3,70±0,89 ^a	3,43±0,55 ^a	4,71±0,64 ^a	8,10±2,12 ^b
3	19,66±8,43 ^a	17,26±6,08 ^a	25,10±9,01 ^a	30,53±7,85 ^a	0,11±0,03 ^a	0,11±0,05 ^a	0,1 ^a 7±0,00	0,21±0,06 ^a	3,17±1,01 ^a	2,93±1,02 ^a	4,28±1,60 ^a	5,17±1,12 ^a
4	14,11±3,43 ^a	12,91±2,21 ^a	15,70±0,95 ^a	24,91±0,39 ^b	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aB}	0,17±0,02 ^{aB}	2,17±0,47 ^a	2,18±0,39 ^a	2,91±0,12 ^a	4,45±0,24 ^b
5	14,14±4,91 ^a	10,23±1,61 ^{aA}	12,89±0,42 ^{aA}	20,86±1,29 ^{aB}	0,09±0,02 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,12±0,02 ^a	0,15±0,02 ^{aB}	2,35±0,67 ^a	1,78±0,29 ^a	2,53±0,16 ^a	3,66±0,06 ^b
6	13,98±7,57 ^a	9,16±2,20 ^{aA}	11,48±0,71 ^{aA}	22,07±0,72 ^{aB}	0,09±0,04 ^{aA}	0,07±0,01 ^a	0,11±0,02 ^{aA}	0,16±0,02 ^{aB}	2,51±0,95 ^a	1,59±0,25 ^a	2,21±0,20 ^a	3,92±0,06 ^b
10	10,08±4,40 ^a	6,12±1,38 ^{aA}	5,94±0,97 ^{aA}	17,24±3,09 ^{aB}	0,08±0,03 ^a	0,06±0,02 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aB}	2,22±0,64 ^a	1,39±0,58 ^{aA}	1,30±0,29 ^{aA}	3,39±0,41 ^{aB}
14	8,43±1,81 ^a	6,58±1,21 ^{aA}	5,55±1,83 ^{aA}	14,77±4,56 ^{aB}	0,05±0,01 ^a	0,06±0,02 ^a	0,05±0,01 ^a	0,13±0,03 ^b	1,53±0,22 ^a	1,42±0,41 ^a	1,19±0,27 ^a	2,92±0,41 ^b
18	8,84±1,02 ^a	6,49±2,47 ^{aA}	7,25±1,26 ^a	12,35±3,11 ^{aB}	0,05±0,01 ^{aA}	0,05±0,02 ^{aA}	0,07±0,01 ^a	0,11±0,02 ^{aB}	1,58±0,26 ^a	1,20±0,50 ^{aA}	1,45±0,18 ^a	2,42±0,86 ^{aB}
22	8,84±1,79 ^a	5,82±1,99 ^a	6,69±1,97 ^a	10,35±2,58 ^a	0,07±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a	0,06±0,01 ^a	0,10±0,02 ^a	1,69±0,42 ^a	1,11±0,44 ^a	1,03±0,28 ^{aA}	2,04±0,61 ^{aB}
26	10,99±2,82 ^{aA}	6,36±1,83 ^a	4,71±1,68 ^{aB}	11,85±1,98 ^{aA,C}	0,08±0,01 ^a	0,06±0,02 ^a	0,05±0,01 ^a	0,12±0,01 ^b	2,03±0,42 ^a	1,24±0,38 ^{aA}	1,09±0,36 ^{aA}	2,31±0,37 ^{aB}
30	11,23±2,39 ^a	5,52±1,76 ^a	4,54±1,92 ^a	10,91±3,70 ^a	0,09±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a	0,05±0,02 ^{aA}	0,12±0,03 ^{aB}	1,95±0,39 ^a	1,04±0,33 ^a	1,03±0,43 ^a	2,16±0,27 ^a
Extrato	Ácido 3,5-dicafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)				Rutina (mg.100 mL ⁻¹)				Ácido 4,5-dicafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)			
	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C
1	25,63±4,33 ^{aA}	21,82±3,86 ^{aA}	33,51±5,61 ^{aB}	41,17±1,19 ^{aB}	5,43±0,70 ^a	4,49±0,73 ^a	5,80±1,31 ^a	9,25±0,79 ^b	7,82±1,15 ^a	6,99±1,13 ^{aA}	12,26±2,5 ^{aB}	12,09±2,06 ^{aB}
2	20,19±5,27 ^{aA}	18,28±3,34 ^{aA}	24,28±3,34 ^a	40,79±12,00 ^{aB}	4,20±1,20 ^{aA}	3,99±0,71 ^{aA}	7,43±0,63 ^a	9,63±2,94 ^{aB}	6,26±1,58 ^{aA}	5,84±0,85 ^{aA}	10,48±1,1 ^{aB}	12,53±1,64 ^{aB}
3	15,89±6,54 ^a	14,71±5,87 ^a	18,23±4,58 ^a	25,50±6,34 ^a	3,65±1,44 ^a	3,15±1,41 ^a	5,71±0,77 ^a	5,95±1,52 ^a	5,03±1,99 ^{aA}	5,07±1,65 ^{aA}	9,11±0,77 ^{aB}	8,25±0,83 ^a
4	11,70±2,93 ^a	11,60±1,96 ^a	15,12±0,62 ^a	20,93±0,66 ^b	2,59±0,88 ^a	2,40±0,52 ^a	3,30±0,13 ^a	4,78±0,10 ^b	3,81±0,93 ^{aA}	3,95±0,57 ^{aA}	5,27±0,19 ^a	7,15±1,19 ^{aB}
5	11,90±4,17 ^a	9,21±1,25 ^{aA}	12,94±0,68 ^a	17,70±0,79 ^{aB}	2,57±0,91 ^a	1,91±0,39 ^a	2,69±0,02 ^a	4,17±0,17 ^b	3,94±1,35 ^a	3,20±0,34 ^{aA}	4,45±0,26 ^a	5,91±1,22 ^{aB}
6	11,90±6,22 ^a	8,30±1,43 ^{aA}	11,26±0,82 ^a	18,49±0,55 ^{aB}	2,49±1,27 ^a	1,63±0,27 ^{aA}	2,31±0,12 ^{aA}	4,16±0,40 ^{aB}	3,96±2,09 ^a	2,92±0,35 ^{aA}	3,95±0,25 ^a	6,30±1,31 ^{aB}
10	9,16±4,50 ^a	7,02±3,05 ^{aA}	5,91±0,97 ^{aA}	14,87±2,36 ^{aB}	1,84±0,80 ^a	1,49±0,65 ^{aA}	1,22±0,13 ^{aA}	3,24±0,73 ^{aB}	3,26±1,57 ^a	2,55±1,04 ^{aA}	2,34±0,42 ^{aA}	5,53±0,77 ^{aB}
14	7,85±1,34 ^a	6,90±1,99 ^a	5,24±1,28 ^{aA}	11,73±3,71 ^{aB}	1,42±0,30 ^a	1,38±0,42 ^a	1,03±0,13 ^{aA}	2,70±0,93 ^{aB}	2,74±0,49 ^a	2,56±0,77 ^a	2,14±0,48 ^a	4,67±2,13 ^a
18	8,03±0,90 ^a	5,87±2,47 ^a	6,49±0,90 ^a	9,55±2,73 ^a	1,50±0,28 ^a	1,19±0,52 ^a	1,02±0,34 ^a	2,04±0,64 ^a	2,88±0,35 ^a	2,23±1,00 ^a	2,15±0,62 ^a	3,86±1,55 ^a
22	8,11±1,81 ^a	5,32±2,10 ^a	5,98±1,64 ^a	7,89±1,79 ^a	1,52±0,38 ^a	1,01±0,39 ^a	1,25±0,32 ^a	1,75±0,51 ^a	2,97±0,68 ^a	2,06±0,87 ^a	1,87±0,52 ^a	3,39±1,00 ^a
26	9,88±2,68 ^{aA}	5,80±1,67 ^a	4,39±1,60 ^{aB}	9,23±1,09 ^a	1,93±0,63 ^a	1,16±0,32 ^a	0,99±0,35 ^a	1,97±0,34 ^a	3,56±0,87 ^a	2,29±0,72 ^a	1,98±0,72 ^a	3,86±1,14 ^a
30	9,64±2,07 ^{aA}	4,90±1,60 ^a	4,02±1,64 ^{aB}	8,20±2,69 ^a	1,89±0,44 ^a	0,95±0,30 ^a	1,70±0,42 ^a	1,78±0,67 ^a	3,56±0,71 ^a	1,96±0,66 ^a	1,85±0,77 ^a	3,73±1,44 ^a

Os resultados expressam a média de uma triplicata ± desvio padrão.

Letras minúsculas iguais em uma mesma linha, entre as colunas, para um mesmo composto, representam médias que não diferiram estatisticamente em um nível de 95% de confiança. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha, entre as colunas, para um mesmo composto, representam médias estatisticamente diferentes em um nível de 95% de confiança

Tabela 3. Concentrações de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de chimarrão preparado a partir da erva-mate tradicional.

Extrato	Ácido 5-cafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)				Ácido cafeico (mg.100 mL ⁻¹)				Ácido 3,4-dicafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)			
	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C
1	26,85±1,25 ^a	25,10±1,93 ^a	26,14±2,78 ^{a,A}	31,11±4,19 ^{a,B}	0,18±0,04 ^a	0,19±0,05 ^a	0,17±0,05 ^a	0,22±0,04 ^a	4,18±0,18 ^a	4,52±0,67 ^a	4,23±0,17 ^a	4,88±0,66 ^a
2	17,71±1,54 ^a	13,46±5,10 ^a	12,95±2,04 ^a	23,94±5,97 ^a	0,10±0,02 ^a	0,09±0,02 ^a	0,10±0,03 ^a	0,19±0,08 ^a	2,70±0,28 ^a	2,74±0,87 ^a	2,11±0,37 ^{a,A}	3,95±0,85 ^{a,B}
3	6,34±1,98 ^a	7,84±4,40 ^a	6,10±0,86 ^a	7,00±1,77 ^a	0,07±0,01 ^a	0,09±0,06 ^a	0,06±0,02 ^a	0,08±0,02 ^a	1,05±0,23 ^a	1,96±0,79 ^a	1,12±0,12 ^a	1,35±0,32 ^a
4	3,95±0,29 ^a	6,56±5,53 ^a	4,08±0,30 ^a	4,34±1,20 ^a	0,05±0,00 ^a	0,07±0,03 ^a	0,04±0,02 ^a	0,07±0,03 ^a	0,68±0,09 ^a	1,63±0,79 ^a	0,78±0,03 ^a	0,91±0,21 ^a
5	2,60±0,27 ^a	5,21±4,03 ^a	3,46±1,60 ^a	3,05±1,35 ^a	0,03±0,01 ^a	0,06±0,02 ^a	0,04±0,00 ^a	0,05±0,02 ^a	0,48±0,02 ^a	1,42±0,65 ^a	0,72±0,26 ^a	0,74±0,19 ^a
6	3,72±2,14 ^a	4,41±4,01 ^a	2,34±0,50 ^a	3,91±2,07 ^a	0,02±0,01 ^a	0,06±0,03 ^a	0,030,00 ^a	0,100,03 ^a	0,95±0,88 ^a	1,150,57 ^a	0,54±0,16 ^a	1,30±0,74 ^a
10	2,37±0,10 ^a	3,63±3,34 ^a	2,07±1,22 ^a	1,37±0,65 ^a	0,02±0,01 ^a	0,04±0,03 ^a	0,02±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,45±0,04 ^a	0,79±0,40 ^a	0,52±0,14 ^a	0,43±0,18 ^a
14	1,47±0,10 ^a	1,53±0,79 ^a	1,50±0,55 ^a	1,55±0,74 ^a	0,01±0,00 ^{a,A}	0,04±0,02 ^{a,B}	0,02±0,00 ^a	0,04±0,01 ^a	0,28±0,00 ^a	0,62±0,49 ^a	0,39±0,01 ^a	0,64±0,06 ^a
18	1,73±0,56 ^a	1,53±1,04 ^a	2,18±0,61 ^a	1,75±0,28 ^a	0,01±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,02±0,02 ^a	0,03±0,01 ^a	0,33±0,07 ^a	0,40±0,17 ^a	0,50±0,38 ^a	0,66±0,03 ^a
22	1,06±0,35 ^a	1,72±0,82 ^a	0,95±0,12 ^a	2,24±0,77 ^a	0,01±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,04±0,01 ^b	0,21±0,03 ^a	0,38±0,03 ^a	0,34±0,14 ^a	0,70±0,14 ^b
26	1,05±0,21 ^a	1,59±0,59 ^a	1,04±0,12 ^a	1,39±0,06 ^a	0,01±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,23±0,03 ^a	0,34±0,04 ^a	0,29±0,02 ^a	0,55±0,03 ^b
30	1,03±0,52 ^a	1,47±0,25 ^a	1,31±0,84 ^a	1,91±1,03 ^a	0,01±0,00 ^{a,A}	0,01±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,04±0,00 ^{a,B}	0,23±0,07 ^a	0,30±0,03 ^a	0,33±0,16 ^a	0,62±0,29 ^a
Extrato	Ácido 3,5-dicafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)				Rutina (mg.100 mL ⁻¹)				Ácido 4,5-dicafeoilquínico (mg.100 mL ⁻¹)			
	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C	65°C	75°C	85°C	95°C
1	23,77±0,93 ^a	22,57±0,94 ^a	23,17±1,76 ^a	27,38±4,14 ^a	4,82±0,31 ^a	4,99±1,26 ^a	4,74±0,47 ^a	5,47±0,75 ^a	7,06±0,34 ^a	6,98±0,42 ^a	7,21±0,37 ^a	8,66±1,23 ^a
2	15,30±1,41 ^a	12,20±4,05 ^a	11,4±61,96 ^{a,A}	21,60±5,43 ^{a,B}	3,10±0,34 ^a	2,59±1,37 ^a	2,36±0,45 ^a	4,31±1,19 ^a	4,82±0,42 ^a	4,21±1,61 ^a	3,82±0,66 ^{a,A}	7,42±1,78 ^{a,B}
3	5,86±1,41 ^a	7,48±3,72 ^a	5,59±0,98 ^a	6,28±1,96 ^a	0,97±0,32 ^a	1,55±1,01 ^a	1,03±0,23 ^a	1,14±0,33 ^a	2,05±0,45 ^a	2,71±1,33 ^a	2,11±0,36 ^a	2,48±0,68 ^a
4	3,75±0,47 ^a	6,00±0,79 ^a	3,71±0,51 ^a	3,60±1,41 ^a	0,64±0,12 ^a	1,31±1,29 ^a	0,64±0,12 ^a	0,63±0,22 ^a	1,34±0,15 ^a	2,11±1,41 ^a	1,47±0,16 ^a	1,56±0,50 ^a
5	2,47±0,17 ^a	4,92±3,33 ^a	3,23±1,84 ^a	2,35±1,38 ^a	0,36±0,07 ^a	1,02±0,91 ^a	0,53±0,30 ^a	0,35±0,21 ^a	0,97±0,08 ^a	1,92±1,25 ^a	1,31±0,66 ^a	1,12±0,50 ^a
6	3,19±1,53 ^a	4,12±3,36 ^a	2,02±0,73 ^a	3,56±1,77 ^a	0,44±0,12 ^a	0,77±0,85 ^a	0,34±0,15 ^a	0,44±0,16 ^a	1,43±0,98 ^a	1,67±1,29 ^a	0,94±0,23 ^a	1,55±0,91 ^a
10	2,29±0,49 ^a	3,33±2,60 ^a	1,85±1,39 ^a	0,92±0,51 ^a	0,35±0,06 ^a	0,64±0,63 ^a	0,28±0,22 ^a	0,14±0,08 ^a	0,93±0,15 ^a	1,40±1,05 ^a	0,87±0,23 ^a	0,54±0,24 ^a
14	1,47±0,10 ^a	1,36±0,45 ^a	1,37±0,35 ^a	1,08±0,31 ^a	0,22±0,02 ^a	0,23±0,12 ^a	0,18±0,01 ^a	0,12±0,05 ^a	0,63±0,03 ^a	0,60±0,16 ^a	0,70±0,17 ^a	0,71±0,11 ^a
18	1,74±0,53 ^a	1,22±0,61 ^a	1,98±1,71 ^a	1,00±0,23 ^a	0,26±0,05 ^a	0,25±0,24 ^a	0,29±0,26 ^a	0,14±0,03 ^a	0,72±0,20 ^a	0,54±0,19 ^a	0,96±0,73 ^a	0,69±0,08 ^a
22	1,11±0,20 ^a	1,46±0,53 ^a	0,80±0,12 ^a	1,60±0,97 ^a	0,15±0,02 ^a	0,26±0,18 ^a	0,14±0,01 ^a	0,22±0,15 ^a	0,48±0,06 ^a	0,65±0,20 ^a	0,49±0,01 ^a	0,96±0,45 ^a
26	1,14±0,11 ^a	1,36±0,30 ^{a,A}	1,04±0,06 ^a	0,80±0,12 ^{a,B}	0,17±0,04 ^a	0,25±0,15 ^a	0,15±0,02 ^a	0,13±0,02 ^a	0,51±0,05 ^a	0,61±0,10 ^a	0,57±0,03 ^a	0,61±0,07 ^a
30	1,14±0,46 ^a	1,41±0,00 ^a	1,22±0,65 ^a	1,24±0,85 ^a	0,17±0,06 ^a	0,22±0,05 ^a	0,20±0,12 ^a	0,19±0,18 ^a	0,52±0,20 ^a	0,65±0,01 ^a	0,66±0,03 ^a	0,85±0,49 ^a

Os resultados expressam a média de uma triplicata ± desvio padrão.

Letras minúsculas iguais em uma mesma linha, entre as colunas, para um mesmo composto, representam médias que não diferiram estatisticamente em um nível de 95% de confiança.

Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha, entre as colunas, para um mesmo composto, representam médias estatisticamente diferentes em um nível de 95% de confiança.

Quando considerada a soma das concentrações dos compostos presentes em todos os extratos, observou-se que aqueles obtidos a 95°C apresentaram uma concentração cerca de duas vezes mais elevada para todos os compostos em relação a obtida a partir da análise dos extratos preparados com água a 75°C. Para os extratos extraídos a 85°C e 65°C, os níveis individuais totais de compostos fenólicos foram, em média, 50% menores.

A despeito desses resultados, ressalta-se que alguns estudos epidemiológicos tem evidenciado a associação do consumo de chimarrão a elevadas temperaturas com o desenvolvimento de câncer de esôfago, laringe e boca. Conforme postularam os realizadores desses estudos, a ingestão continuada da bebida a temperaturas muito altas pode ocasionar lesões na mucosa dessa região, favorecendo o desenvolvimento dessa patologia (LORIA, BARRIOS, ZANETTI, 2009). Embora estes estudos não sejam totalmente conclusivos, pesquisas realizadas com outros alimentos consumidos a altas temperaturas (chás) também estabeleceram correlação positiva entre a sua ingestão e o aparecimento de câncer, de forma que a ingestão contínua de alimentos a altas temperaturas não é recomendada (LORIA, BARRIOS, ZANETTI, 2009). Além disso, durante a condução dos experimentos, foi possível perceber a dificuldade que um consumidor de chimarrão teria para ingerir a bebida a 95°C, sendo provável que o mesmo devesse aguardar a temperatura tornar-se mais amena para então consumir o produto. Como o chimarrão é uma bebida de consumo contínuo e imediato (infusão rápida), é possível que a temperatura de 95°C seja pouco utilizada na prática.

Ressalta-se ainda que embora o emprego de temperaturas inferiores para o preparo do chimarrão com erva-mate moída grossa tenha resultado em extratos com menores níveis de ácido 5CQ, ácido 3,4DQ, ácido 3,5DQ, ácido 4,5DQ e rutina, estes ainda são considerados elevados em comparação com outras bebidas (MARQUES, FARAH, 2009). Nesse sentido, o presente estudo torna-se valioso ao demonstrar que é possível realizar o preparo do chimarrão a partir das ervas-mate tradicional e moída grossa com temperaturas mais brandas (65°C e 75°C) sem que hajam perdas significativas na transferência de compostos biologicamente ativos da erva para a bebida ingerida.

A partir das **Tabelas 2 e 3** é possível inferir que, independentemente da temperatura empregada, as concentrações individuais dos compostos fenólicos nos extratos aquosos de erva moída grossa foram superiores aos verificados nos extratos obtidos a partir da erva

tradicional. Além disso, foi verificado que os níveis dos compostos nos extratos preparados a partir da erva-mate tradicional decresceram mais rapidamente ao longo das sucessivas adições de água na cuia do que naqueles preparados com a erva-mate moída grossa, como pode ser observado nos gráficos das Figuras 2 e 3. Este comportamento pode ser parcialmente atribuído a maior permeabilidade a água desta última, como já descrito anteriormente (MEINHART *et al.*, 2010; BIZZOTO *et al.*, 2012). Porém, durante a condução dos experimentos foram observadas algumas características particulares de extração de cada erva-mate, as quais possivelmente afetaram a concentração de compostos transferidos da erva para a água de infusão. Durante o preparo dos extratos de chimarrão, a adição da água causa a liberação de uma pequena porção de erva do montante disposto contra a parede da cuia, porção esta que entra em infusão completa e contribui significativamente para a transferência dos compostos fenólicos. Embora durante a execução das extrações a disposição da erva tenha sido cuidadosamente mantida, foi verificado que em relação a erva-mate tradicional, a quantidade de erva-mate moída grossa liberada e mantida em infusão completa a cada adição de água na cuia foi naturalmente superior para todos os extratos, fato que está ligado a menor capacidade de compactação desta erva. Assim, o maior volume de erva em contato com a água de infusão favoreceu a obtenção de extratos com maiores níveis de compostos fenólicos.

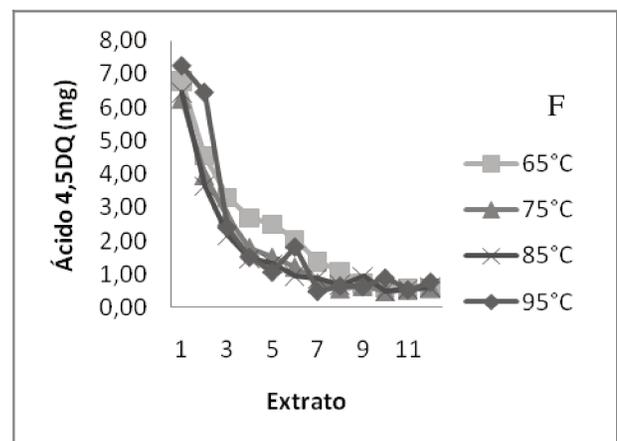
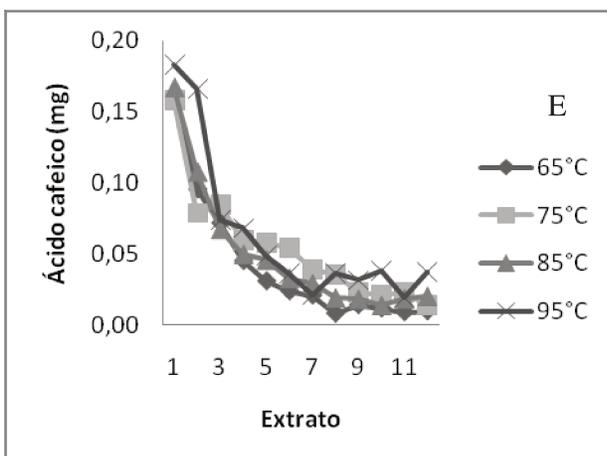
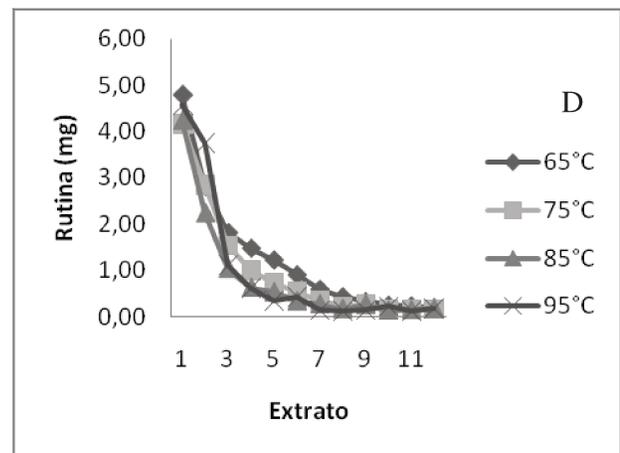
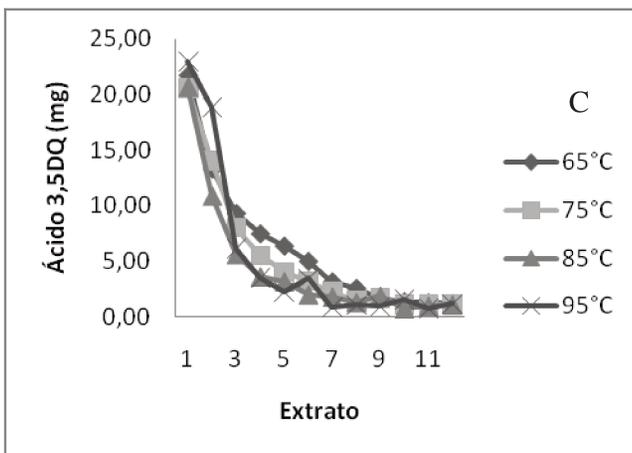
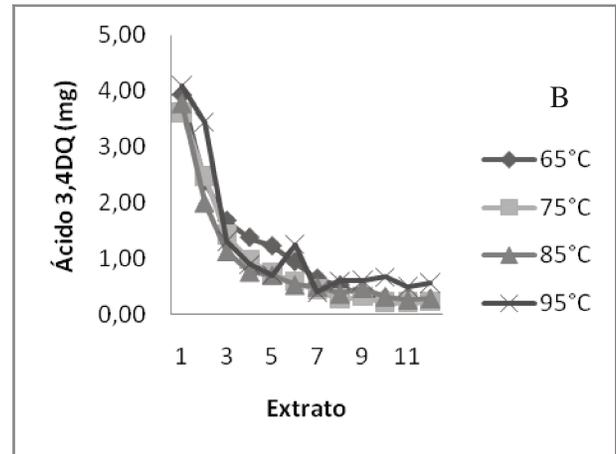
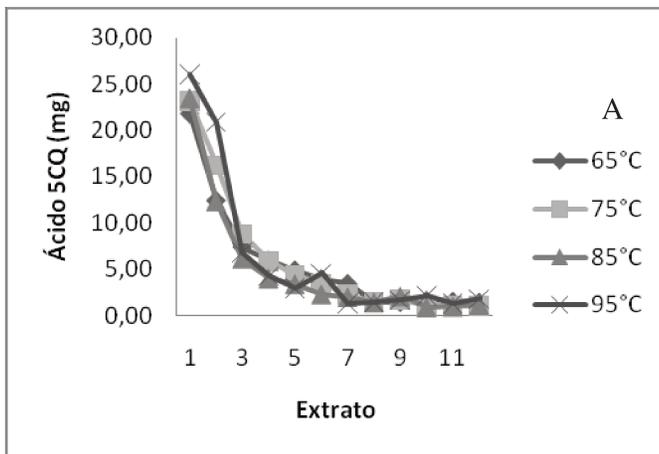


Figura 2. Concentração de (A) ácido 5-cafeoilquínico, (B) ácido 3,4-dicafeoilquínico, (C) ácido 3,5-dicafeoilquínico, (D) rutina, (E) ácido cafeico e (F) ácido 4,5-dicafeoilquínico nos extratos aquosos de chimarrão obtidos a partir da erva-mate tradicional.

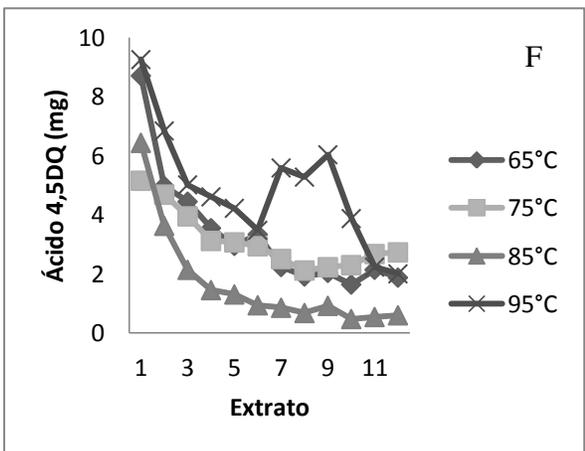
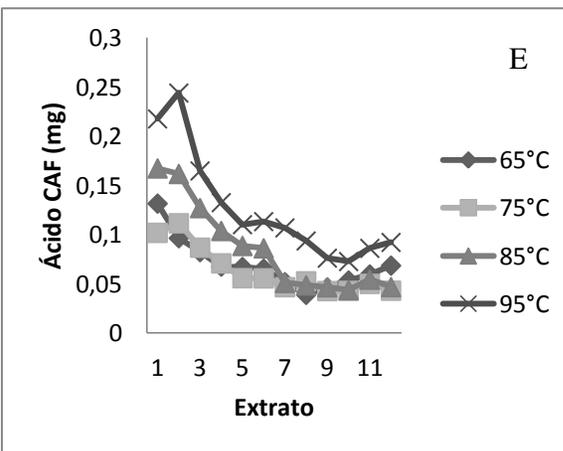
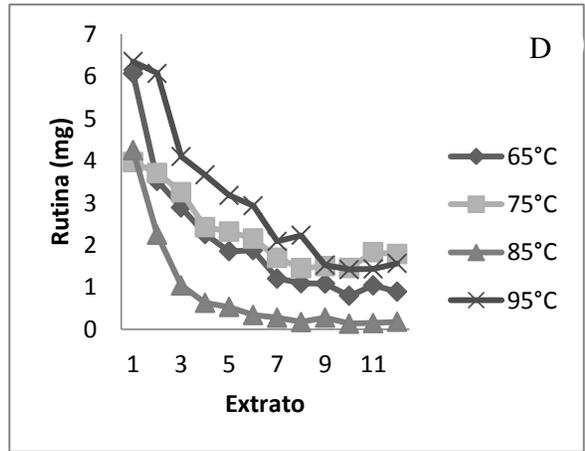
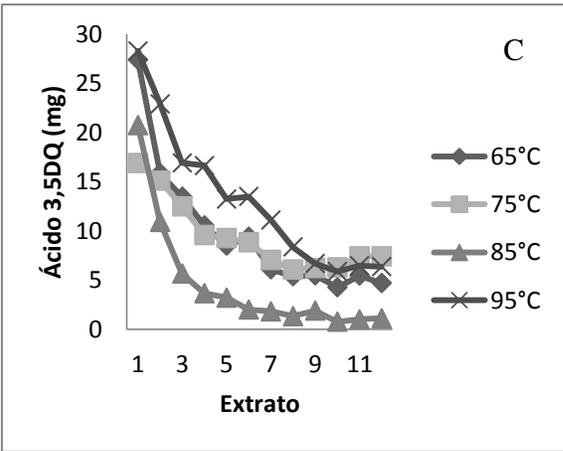
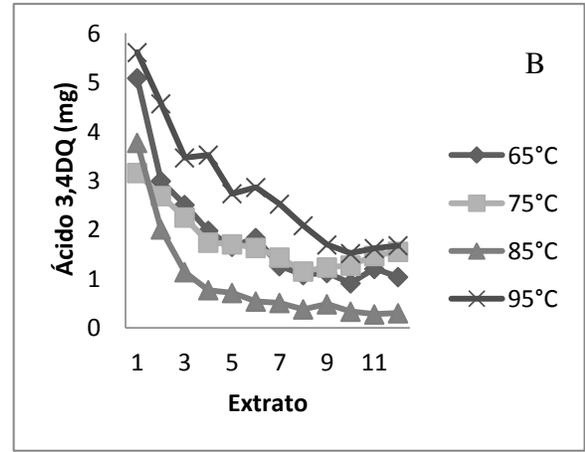
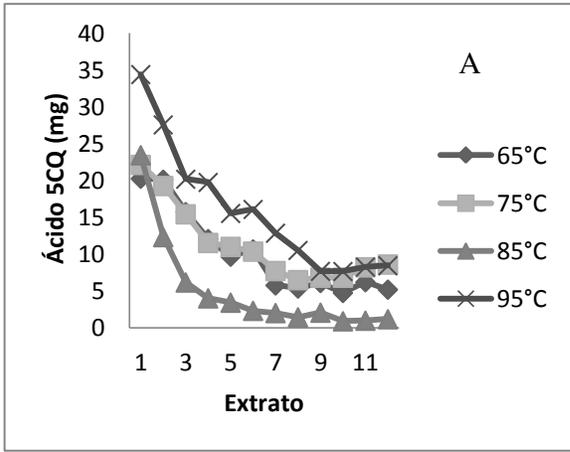


Figura 3. Teor de (A) ácido 5-cafeoilquínico, (B) ácido 3,4-dicafeoilquínico, (C) ácido 3,5-dicafeoilquínico, (D) rutina, (E) ácido cafeico e (F) ácido 4,5-dicafeoilquínico nos extratos aquosos de chimarrão obtido a partir da erva-mate moída grossa.

3.3 Conteúdo de compostos fenólicos e porcentagem transferida para os extratos de chimarrão

Na **Tabela 4** pode ser visualizado o conteúdo total do ácido 5CQ, ácido 3,4DQ, ácido 3,5DQ, ácido cafeico, ácido 4,5DQ e rutina extraído a partir das ervas-mate tradicional e moída grossa. Através da análise estatística, foi verificado que não houve diferença significativa, em um nível de confiança de 95%, entre o teor individual dos compostos fenólicos presentes nas ervas-mate tradicional e moída grossa, exceto para o teor de ácido 4,5-dicafeoilquínico. Os resultados demonstraram que a erva-mate contém altas concentrações de rutina e de compostos pertencentes à família dos ácidos clorogênicos (5CQ, 3,4DQ, 3,5DQ e 4,5DQ), os quais constituem os fenólicos majoritários desta planta. Dentre a literatura pesquisada, não existem registros de alimentos ou plantas que contenham concentrações tão elevadas de substâncias dessa classe, com exceção das sementes verdes de *Coffea canephora* v. Conillon (9,5 mg.100g⁻¹) (MARQUES, FARAH, 2009).

De acordo com a **Tabela 4**, o composto presente em maior concentração foi o ácido 3,5DQ, seguido pelo ácido 5CQ. A predominância desses compostos corrobora os resultados encontrados por Marques e Farah (2009) e Filip e colaboradores (2001). As concentrações dos compostos fenólicos quantificados no presente trabalho estão em concordância com os níveis descritos na literatura para estes compostos (MARQUES, FARAH, 2009; RIBANI, 2006; DUTRA, RIBANI, 2010; PAGLIOSA *et al.*, 2010; BIZZOTO *et al.*, 2012).

Na **Tabela 5** pode ser visualizada uma estimativa dos teores totais ingeridos de cada composto fenólico ao final de 30 adições de água na cuia. Estes valores foram obtidos ajustando-se as concentrações das **Tabelas 2 e 3** ao volume médio de chimarrão extraído para cada erva-mate, que representa o volume que seria sorvido pelo consumidor, e considerando-se a média das concentrações dos compostos obtidas nos extratos em que a variação da temperatura da água para o preparo da bebida não foi significativa (65°C, 75°C e 85°C para a moída grossa e todas as temperaturas estudadas para a tradicional). Na **Tabela 5** também estão apresentados os percentuais dos compostos fenólicos extraídos durante as infusões em relação aos conteúdos totais que constam na **Tabela 4**.

Tabela 4. Concentração dos compostos após extração exaustiva das ervas-mate tradicional e moída grossa.

Compostos	Tradicional (mg.g⁻¹)	Moída grossa (mg.g⁻¹)
5CQ	16,23±0,53 ^a	16,01±0,07 ^a
CAF	0,13±0,01 ^a	0,13±0,02 ^a
3,4DQ	3,02±0,11 ^a	2,96±0,04 ^a
3,5DQ	20,59±0,74 ^a	20,05±0,10 ^a
RUT	4,50±0,21 ^a	4,68±0,10 ^a
4,5DQ	5,79±0,20 ^a	5,35±0,07 ^b

Letras minúsculas iguais, para um mesmo compostos, entre as colunas, em uma mesma linha, denotam médias que não diferem estatisticamente entre si, em um nível de 95% de confiança. 5-CQ = ácido 5-cafeoilquínico; CAF = ácido cafeico; 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5DQ = ácido 3,5-dicafeoilquínico; RUT = rutina; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Os percentuais dos compostos transferidos para os extratos foram, em média, duas vezes maiores para os obtidos a partir da erva-mate moída grossa, o que pode ser atribuído aos efeitos produzidos pelas diferenças entre o nível de compactação das ervas e entre a quantidade de erva que permanece em infusão completa quando a água é adicionada na cuia, como já descrito anteriormente neste artigo.

Os percentuais individuais dos compostos transferidos da erva-mate para os extratos de chimarrão atingidos neste estudo são inferiores aos alcançados nos trabalhos realizados por Ribani (2006), em que foram obtidos 100% de transferência de ácido 5CQ e 89% de rutina, e Marques e Farah (2009), no qual foi obtido 100% de transferência de ácido 5CQ, ácido 3,4DQ, ácido 3,5DQ e ácido 4,5DQ. Porém, ressalta-se que nestes estudos foi realizada a infusão total da erva na água, procedimento que não representa o preparo de um chimarrão, que consiste em uma infusão parcial.

Tabela 5. Teor de ácido 5CQ, ácido CAF, ácido 3,4DQ, ácido 3,5DQ, RUT e ácido 4,5DQ ingeridos através do consumo de chimarrão e percentuais extraídos em relação ao conteúdo total de cada um desses compostos.

Compostos	Erva mate			
	Tradicional* (mg)	% Extraída	Moída grossa* (mg)	% Extraída
5CQ	95,93±14,14	6,95	218,11±40,07	15,81
CAF	1,02±0,26	9,25	1,66±0,17	15,06
3,4DQ	20,84±3,96	8,12	39,38±6,11	15,65
3,5DQ	85,26±10,70	4,87	193,83±30,44	11,37
RUT	15,72±3,63	4,11	40,88±5,48	10,28
4,5DQ	34,07±2,59	6,92	70,97±8,57	15,61

*Teor em 30 extratos de chimarrão.

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico; CAF = ácido cafeico; 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5DQ = ácido 3,5-dicafeoilquínico; RUT = rutina; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

3.4 Compostos fenólicos nos extratos de chimarrão normalmente ingeridos pelo consumidor e comparação com outras bebidas

A partir dos níveis dos compostos apresentados nas **Tabelas 2 e 3**, é possível afirmar que os extratos aquosos de chimarrão constituem uma excelente fonte de ácidos clorogênicos e do flavonoide rutina. Bastos e colaboradores (2005) e Mazzafera (1996) estimaram que 500 mL de extrato de chimarrão contém cerca de 226 mg e 240 mg de ácido 5CQ, respectivamente. Ribani (2006) determinou que a mesma quantidade de chimarrão apresentou 167 mg de ácido 5CQ e 50 mg de RUT. Neste trabalho, o mesmo volume de extratos de chimarrão de moída grossa (equivalente a soma do volume de 5 extratos), apresentou, 107 mg de ácido 5CQ, 0,66 mg de ácido cafeico, 16 mg de ácido 3,4DQ, 88 mg de ácido 3,5DQ, 19 mg de RUT e 31 mg de ácido 4,5DQ. Em geral, grandes volumes de extratos de chimarrão são ingeridos por um indivíduo durante um dia inteiro. Para um consumidor assíduo da bebida, que ingere cerca de um litro de chimarrão por dia, o que corresponderia a cerca de 10 a 12 adições de água na cuia, estes níveis dobrariam.

Marques e Farah (2009) determinaram os teores de ácido 5CQ, ácido 3,4DQ, 3,5DQ, 4,5DQ e ácido CAF em uma xícara de 200 mL de uma infusão total preparada com 1g de erva-mate, e encontram, respectivamente: 14,75 mg, 5,37 mg, 29,23 mg, 15,19 mg e 0,19. No presente estudo, um mesmo volume de extratos de chimarrão (cerca de duas adições consecutivas de água na cuia) forneceria aproximadamente o dobro dessas concentrações.

Em comparação com outras bebidas e de acordo com os valores das **Tabelas 2 e 3**, o teor de ácido 5CQ presente no primeiro extrato de chimarrão preparado com as ervas-mate tradicional e moída grossa corresponde aos níveis presentes em 150 e 200 mL de suco de ameixa (DONOVAN, MEYER, WATERHOUSE, 1998), respectivamente. O teor desse composto para o primeiro extrato de moída grossa é cerca de 136 vezes mais elevado do que em 100 mL de chá preto e 185 vezes maior do que o verificado no mesmo volume de chá verde. Para a erva-mate tradicional, estes valores são 113 e 154 vezes mais elevados, respectivamente (MARQUES, FARAH, 2009). O teor de ácido cafeico para o primeiro extrato obtido de ambos os tipos de erva-mate estudados equivale ao consumo de 50 mL de suco ou cidra de maçã (KAHLE, KRAUS, RICHLING, 2005), a ingestão de 200 mL de vinho branco ou 1000 mL de suco de uva (GRUZ, NOVAK, STRNAD, 2008).

O café constitui a principal fonte de ácidos clorogênicos para a dieta humana, sendo o ácido 5-CQ o composto presente em concentrações majoritárias. Uma xícara de café (100 mL) apresenta 30 mg de ácido 5CQ, 2,4 mg de ácido 3,4DQ, 1,62 mg de ácido 3,5DQ e 1,45 mg de ácido 4,5DQ (DUARTE, FARAH, 2011). O mesmo volume de extrato de chimarrão (extrato 1) contém, aproximadamente, a mesma concentração de ácido 5-CQ, o dobro da concentração de ácido 3,4DQ, 15 vezes mais ácido 3,5DQ e um teor seis vezes mais elevado de ácido 4,5DQ. Assim, é possível afirmar que os extratos de chimarrão constituem uma excelente fonte de ácidos clorogênicos, alternativa ao café.

No que se refere ao teor de rutina, os níveis encontrados para os extratos de chimarrão são muito superiores aos descritos para outras bebidas, como o vinho Syrah brasileiro (0,24 mg.100 mL⁻¹) (BALLUS *et al.*, 2012), suco de noni (0,188 mg.100 mL⁻¹) (DENG, WEST & JENSEN, 2010) e suco de acerola (0,058 mg.100 mL⁻¹) (MEZADRI *et al.*, 2008).

4 CONCLUSÃO

A erva-mate apresenta altas concentrações de compostos fenólicos, sendo os ácidos clorogênicos os componentes majoritários presentes nesta planta.

O aumento da temperatura favoreceu a extração dos compostos fenólicos para os extratos aquosos obtidos a partir da erva-mate moída grossa, porém, o mesmo não foi observado para aqueles preparados a partir da erva-mate tradicional. Por outro lado, os resultados indicaram que se o consumidor optar por utilizar água a temperaturas mais brandas (65°C e 75°C), para ambos os tipos de erva-mate, as concentrações individuais de compostos fenólicos nos extratos aquosos ainda são elevadas.

Os resultados demonstraram que os extratos de chimarrão constituem uma excelente fonte de compostos fenólicos para a dieta. O hábito de consumir chimarrão implica na ingestão diária de grandes volumes dessa bebida e, conseqüentemente, de elevados níveis de compostos fenólicos, em especial de ácidos clorogênicos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2012/12565-0), pelo auxílio financeiro à pesquisa e à CAPES pela concessão da bolsa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T.W.; OLIVEIRA K.A., FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.D.E.O.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, p. 2127–2133, 2009.

- ASTILL, C.; BIRCH, M.R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P.G.; MARTIN, P.T. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5340-5347, 2001.
- BALLUS, C.A.; MEIHART, A.D.; OLIVEIRA, R.G.; GODOY, H.T. optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, v. 45, p. 136-144, 2012.
- BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; SOARES, R.A.M.; TORRES, E.A.F.S. The chlorogenic acid and caffeine content of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farm Bonaerense**, v.24, n. 1, p. 91-95, 2005.
- BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Yerba mate: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p.37-46,2007.
- BRACESCO, N. DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A, NUNES, E.. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, n. 9, p. 379, 2003.
- 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 bevarages. **Food International Research**, v.40, p. 393-405, 2007.
- BIZZOTO, C.S.; MEINHART, A.D.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; BALLUS, C.A.; GODOY, H.T. Quantification of phenolic compounds by

capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, p. 763-768, 2012.

BOAVENTURA, B.C.B.; MURAKAMI, A.N.N.; PRUDÊNCIO, E.S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F.S.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.C. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002864#>. Acesso: Dezembro, 2012.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379-389, 2003.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; DE MARIZ E MIRANDA, L.S.; SALVADOR, E. Stability of 5-cafeoylquinic acid under different conditions of heating. **Food research international**, v.31, n. 6-7, p.475-477, 1998.

DAWIDOWICZ, A.L.; TYPEK, R. Thermal stability of 5-o-cafeoylquinic acid in aqueous solutions at different heating conditions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p.12578-12584, 2010.

DE MORAIS E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; BOAVENTURA, B.C.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E.L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n.23, p. 8316-8324, 2009.

- DENG, S.; WEST, B.J.; JENSEN, J.C. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**, v. 122, p.267-270, 2010.
- DONOVAN, J.L.; MEYER, A.S.; WATERHOUSE, A.L. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, p. 1247-1252, 1998.
- DUARTE, G.S.; FARAH, A. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids bioavailability in humans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59, p. 7925-7931, 2011.
- DUTRA, F.L.G.; RIBANI, R.H. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v. 33, n.1, p. 119-123, 2010.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v.24, n. 10, p. 851–874, 2004.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Plant Physiology**, v.18, n.1, p. 23-26, 2006.
- FILIP, R. LOPÉZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.774-778, 2001.
- HECK, C.I.; SCHMALKO, M.; MEIJA, E.G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, p. 8394–8403, 2008.

- GAO, H., LIU, Z.; WAN, W.; QU, X.; CHEN, M. Aqueous Extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Phytotherapy research**, Published online in Wiley Online Library, 2012.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*, induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338–344, 1996.
- GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J.. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, p. 339–344, 2009.
- GRUZ, J.; NOVAK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. **Food chemistry**, v.111, p.789-794, 2008.
- KAHLE, K. KRAUS, M.; RICHLING, E. X. Polyphenol profiles of apple juices. **Molecular nutrition food research**, v. 49, p. 797-806, 2005.
- KAZŁOWSKA, K; HSU, T.; HOU, C.; YANG, W, TSAI, G. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentate*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 123-130, 2010.
- LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Revista Panamericana salud publica**, v. 25, n.6, p. 530-539, 2009.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370–1376, 2009.
- MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v.60, n.1, p. 67-71, 1997.

- MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNANDEZ-PÁCHON, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 282-290, 2008.
- MURAKAMI, A.N.N. AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMANTE, D.R.; ZANOTTA, L.M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J.C.C; TEÓFILO, R.F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A.St.Hil) extract nanofiltration. **Food Science and technology**, v. 44, n, p. 2211-2216, 2011.
- MEINHART, A. D.; BIZZOTO, C.S.; BALLU, C.A.; RYBKA,A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; CERRO-QUINTANA, R.S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H.T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 58, p.2188-2193, 2010.
- NISHIYAMA, M.F.; M.A.F.COSTA; COSTA, A.M.; SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G.; BRACHT, CK.; PERALTA, R.M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 191-196, Maio 2010.
- PAGANINI S.F.L.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E.B.; SOUZA-SOARES, L.A.; SOARES, M.C.; VAZ, M.R.; MUCCILLO, B. A.L. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological research for nursing**, v. 7, n.2, p. 146-156, 2005.
- PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.A. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v.122, p.173-178, 2010.

RIBANI, R.M. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. 2006. 158p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SHENBAGAM, M.; NALINI, N. Dose response effect of rutin a dietary antioxidant on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance –a histopathologic study. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.25, p.493-502, 2011.

VANSCHIEDT, W., RABE, E., NAZER-HIJAZY, B., RAMELET, A.A., PARTSCH, H., DIEHM, C., SCHULTZ-EHRENBURGH, U., F. SPENGLER, M. WIRSCHING, V. GÖTZ, J. SCHNITKER AND H.H. HENNEICKE-VON ZEPPELIN, The efficacy and safety of a coumarin-troloxerutin combination (SB-LOT) in patients with chronic venous insufficiency: a double blind placebo controlled randomized study, **VASA**, v. 31, p. 185-190, 2002.

UNKAUF, M.; REHN, D., KLINGER, J.; DE LA MOTTE, S.; GROSSMANN, K. Investigation of the efficacy of oxerutins compared to placebo in patients with chronic venous insufficiency treated with compression stockings, **Arzneimittelforschung**, v 46, p. 478-482, 1996.

**“ESTUDO MULTIVARIADO DO EFEITO DO TEMPO DE INFUSÃO, DA
TEMPERATURA E DO VOLUME DE ÁGUA SOBRE A EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS
CLOROGÊNICOS NO PREPARO DA BEBIDA DE CHÁ MATE”**

Tayse F.Ferreira da Silveira, Adriana D. Meihart, Thaís Cristina Lima de Souza, Elenice
Carla Emídio Cunha, Maria Rosa de Moraes e Helena Teixeira Godoy

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP: 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

A bebida de chá mate, resultante da infusão de folhas e talos tostados de *Ilex paraguariensis*, é a mais consumida no Brasil e é rica em ácidos clorogênicos, uma família de compostos fenólicos presentes em concentrações majoritárias no chá mate que apresentam atividade antioxidante, hipoglicêmica, vasoprotetora, neuroprotetora, anti-inflamatória, anti-obesidade e anti-câncer. Neste estudo foi empregado um planejamento composto central para avaliar o efeito do tempo de infusão, da temperatura e do volume de água sobre a concentração do ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico na bebida pronta para consumo. A partir dos modelos matemáticos ajustados, as respostas foram simultaneamente otimizadas com o auxílio da função de desejabilidade de Derringer e Suich a fim de obter o máximo teor dos ácidos clorogênicos no produto pronto para o consumo. A condição ótima foi aplicada nas bebidas de chá mate obtidas a partir de 15 amostras comerciais de chá mate a granel. O teor individual de ácidos clorogênicos foi determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência. A ANOVA indicou que, em um nível de 95% de confiança, não houve falta de ajuste para os modelos lineares ($p > 0,05$) e que os modelos matemáticos gerados a partir das respostas do planejamento foram significativos, portanto, estes puderam ser utilizados para prever as condições ótimas de preparo da bebida de chá mate. Os resultados indicaram que o uso de temperaturas mais elevadas, maior tempo de infusão e maior volume de água apresentaram efeito positivo. O máximo do teor de ácidos clorogênicos presentes na bebida foi obtido quando a infusão foi realizada com 2 g de chá mate (conteúdo aproximado de um sachê), adicionadas de 300 mL de água à 95°C, sob infusão durante 16 minutos. Quando comparados aos teores de ácidos clorogênicos presentes nas bebidas preparadas de acordo com as instruções do fabricante, os níveis obtidos no ponto ótimo também foram superiores. As bebidas de chá mate preparadas a partir de amostras comerciais empregando as condições ótimas de tempo de infusão, temperatura e volume de água apresentaram teores que variaram entre $3,72 \pm 0,17$ mg e $31,06 \pm 8,75$ mg para o ácido 5-cafeoilquínico, $0,52 \pm 0,01$ mg e $6,17 \pm 0,99$ mg para o ácido 3,4-dicafeoilquínico, $0,33 \pm 0,043$ mg e $26,18 \pm 9,96$ mg para o ácido 3,5-dicafeoilquínico e $0,80 \pm 0,02$ mg e $15,84 \pm 5,69$ mg para o ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Palavras chave: *Ilex paraguariensis*, ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, Derringer e Suich, otimização multivariada.

ABSTRACT

Mate tea beverage, which consists on the leaves and stems of *Ilex paraguariensis* under infusion, is the most consumed tea beverage in Brazil. Chlorogenic acids, a family of compounds present in major concentrations in mate tea, are known by presenting high antioxidant capacity, hypoglycemic and vasoprotector effects, anti-inflammatory, anti-obesity and anti-cancer properties. This study employed a central composite design to evaluate the effect of time infusion, temperature and volume infusion upon the concentration of 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5- dicaffeoylquinic at the ready to drink mate tea. From the adjusted mathematical models, the responses were simultaneously optimized with the help of Derringer and Suich's desirability function, aiming to obtain the maximum levels of chlorogenic acids at the mate tea drink ready for consumption. The optimal condition found was applied to mate tea drinks prepared from 15 commercial samples (loose leaves) of mate tea. The individual content of chlorogenic acids was determined by high performance liquid chromatography. The data indicated that the use of higher temperatures and the increase of time infusion, as well as volume of water, presented a positive effect. The maximum content of chlorogenic acids present in mate tea drinks were obtained when using 2 g of mate tea, added of 300 mL of water at 95°C, 16 minutes of time infusion. At these conditions, the migration efficiency of the compounds from tea to mate tea drink was high. When compared to chlorogenic acids concentrations present in mate tea drinks prepared according to fabricant instructions, the levels obtained in the optimal condition were superior. The contents of 5-cafeoylquinic, 3,4-dicaffeoylquinic, 3,5-decaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic acids present in mate tea drinks obtained from commercial samples prepared at the optimal conditions varied between 3.72 and 31.06, 0.52 ± 0.01 mg and 6.17 ± 0.99 mg, 0.33 ± 0.043 mg and 26.18 ± 9.96 mg, and 0.80 ± 0.02 mg and 15.84 ± 5.69 mg, respectively. According to data, mate tea drinks can represent an important source of chlorogenic acids for the human diet.

Key words: *Ilex paraguariensis*, caffeoylquinic acids, dicaffeoylquinic acids, Derringer and Suich, multivariate optimization.

1 INTRODUÇÃO

Bebidas a base de chás estão entre as mais populares do mundo. O seu consumo aumentou em cerca de 30% na última década, o que pode ser atribuído principalmente aos estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram a relação inversa entre seu consumo e o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas (MACKAY & BLUMBERG, 2002; MARTINS *et al.*, 2009; BHATTACHARYA, MUKHOPADHYAY & GIRI, 2011). Os benefícios à saúde associados à ingestão dessas bebidas têm sido correlacionados à presença de compostos fenólicos, que são os constituintes mais importantes dos chás e apresentam potente atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (ASTILL *et al.*, 2001; ATOUI *et al.*, 2005; MATSUBARA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

O preparo da bebida de chá mate consiste na infusão de folhas e talos, previamente moídos e tostados, da planta *Ilex paraguariensis* St. Hill, nativa da América do Sul (SOUZA, 2009). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o consumo *per capita* de chás, em 2008-2009, foi de 0,500 kg/ano, sendo que 0,482 kg refere-se exclusivamente ao chá mate (IBGE, 2009). As folhas e talos de *Ilex paraguariensis* são ricas em ácidos clorogênicos, uma classe de substâncias composta por ésteres formados entre certos derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico e ácido cafeico) com o ácido quínico. Os principais representantes desta família de compostos na *Ilex paraguariensis* são os ésteres do ácido cafeico e seus isômeros mono e dicafeoilquínicos. (CLIFFORD, 1999; MARQUES, FARAH, 2009).

Os ácidos clorogênicos apresentam potente atividade antioxidante e o consumo de alimentos que contenham essas substâncias pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e patologias relacionadas ao envelhecimento (SHIBATA *et al.*, 1999; GUGLIUCCI, BASTOS, SCHULZE, 2009; SUZUKI *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2010; MULLEN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; NISETEO *et al.*, 2012). Ensaios *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que estes compostos apresentam efeitos hipotensivos e vasoprotetores (SUZUKI *et al.*, 2006); hipoglicêmicos (TUOMILEHTO *et al.*, 2004; JOHNSTON, CLIFFORD, MORGAN, 2003) antivirais (ZHU *et al.*, 1999; MA *et al.*, 2010;), propriedades anti-obesidade (CHO *et al.*, 2010), neuroprotetoras (SCHINELLA, FANTINELLI, MOSCA, 2005; BELKAID *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2012), anti-inflamatória

(PUANGPRAPHANT, ARÇARI *et al.*, 2011) e anti-câncer (PUANGPRAPHANT *et al.*, 2011).

Alguns desses benefícios já foram comprovados em ensaios *in vivo*, os quais demonstraram que o consumo regular de chá mate pode ser um importante aliado na prevenção de algumas patologias. GAO e colaboradores (2012) administraram doses diárias de chá mate em ratos hiperlipidêmicos. Os autores verificaram que os indivíduos que ingeriram o chá apresentaram perda de massa corporal, diminuição dos níveis de lipídios no sangue e menor deposição de gordura hepática, sugerindo que o consumo de chá mate pode contribuir para a diminuição do risco de arteriosclerose. Corroborando com estes resultados, Boaventura e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da ingestão de chá mate (1 litro durante 90 dias) sobre biomarcadores de estresse oxidativo em 74 voluntários dislipidêmicos. Os autores verificaram que o consumo da bebida elevou a capacidade antioxidante do plasma e do sangue e diminuiu os níveis séricos de LDL no sangue desses indivíduos, sugerindo que o chá mate pode atuar como um eficiente suplemento da dieta para a prevenção de doenças cardiovasculares. Recentemente, Pereira e colaboradores (2012) forneceram doses diárias de chá mate juntamente com soluções de glicose para ratos e constataram que o consumo dos extratos de chá estimulou a absorção de glicose no organismo, indicando que a ingestão de chá mate possui propriedades anti-hiperglicêmicas e pode auxiliar no controle da concentração sanguínea de glicose. Resultado similar foi encontrado por Klein e colaboradores (2011), ao administrar doses diárias de chá mate (330 mL/3 vezes ao dia) em 29 indivíduos pré-diabéticos e 29 portadores de diabetes mellitus tipo 2. Os efeitos anti-obesidade oriundos do consumo do chá mate já foram relatados por Arçari e colaboradores (2009) e Pang, Choa e Park (2008) em um estudo conduzido em ratos obesos. Ambos os autores constaram que o grupo que consumiu chá mate apresentou perda de peso e diminuição dos níveis séricos de lipídios e glicose, postulando ainda que o tratamento com chá mate apresentou efeito modulatório sobre alguns genes relacionados a obesidade.

Tendo em vista que estas propriedades benéficas estão associadas aos componentes extraídos da planta, o estudo da composição química das bebidas torna-se de elevada importância (ASTILL *et al.* 2001; NISHIYAMA *et al.*, 2010). Diversos estudos univariados realizados com outros chás evidenciaram que a forma de preparo das bebidas,

no que se refere ao tempo e temperatura de infusão, bem como o volume água utilizado, afetam diretamente a composição química das bebidas prontas para consumo (RUSAK *et al.*, 2008; NISHYIAMA *et al.*, 2010, KOMES *et al.*, 2010). No entanto, não foram encontrados na literatura pesquisada, estudos de otimização das condições de preparo de bebidas com infusão à quente, a partir de chá mate, a fim de obter o máximo de eficiência de extração de ácidos clorogênicos no produto pronto para beber.

Os planejamentos experimentais multivariados têm sido utilizados com eficiência para a otimização de processos, uma vez que permitem investigar os efeitos de interação entre variáveis independentes, reduzem o número de experimentos e possibilitam a construção de modelos empíricos para prever as condições experimentais mais adequadas para a execução do sistema estudado. Entretanto, quando se deseja otimizar processos que envolvam um elevado número de respostas, é improvável que a região ótima para todas elas seja a mesma. Nesse sentido, a técnica de Derringer e Suich, baseada na construção de uma função global de desejabilidade envolvendo todas as respostas obtidas no planejamento fatorial, constitui uma importante ferramenta para se alcançar a otimização simultânea das respostas do sistema (BALLUS *et al.*, 2011; MEINHART *et al.*, 2011).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi empregar um planejamento composto central e a técnica de otimização simultânea de Derringer e Suich para otimizar as condições de preparo da bebida proveniente do chá mate, com a finalidade de obter o máximo de transferência dos ácidos clorogênicos, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico do chá para a bebida normalmente preparada e ingerida pelo consumidor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e amostras

Os padrões dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico foram adquiridos da Biopurify (Chengdu, China). As soluções estoque foram preparadas em metanol, na concentração de 1 mg.mL^{-1} , e armazenadas a -18°C por

no máximo 1 mês. O ácido fórmico de grau analítico foi adquirido da Ecibra (São Paulo, Brasil) e o metanol grau cromatográfico, da Merck (Alemanha).

O chá mate utilizado no preparo das bebidas do planejamento composto central foi obtido a partir de uma mistura de 2 marcas de chá mate comercializado a granel (folhas soltas) disponíveis em supermercados da cidade Campinas, sendo um lote de cada. Os chás possuíam tamanho de partícula aproximado de 500 mesh e foram estudados nessa granulometria a fim de representar as condições de preparo do consumidor. O conteúdo das embalagens foi misturado e homogeneizado, e esta mistura foi utilizada para o preparo das bebidas durante a execução dos experimentos.

2.2 Otimização multivariada e tratamento de dados para a otimização simultânea das respostas

Utilizou-se um planejamento composto central 2^3 , com três replicatas verdadeiras no ponto central. Foram investigados os efeitos de três variáveis: tempo de infusão das folhas, temperatura de infusão e volume de água empregado para o preparo das bebidas. Os níveis estudados estão apresentados na **Tabela 1**. As respostas avaliadas foram os teores de ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (em mg) na bebida final, pronta para consumo. Todos os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória.

Tabela 1. Variáveis e níveis experimentais para o planejamento composto central 2^3 .

Variáveis	Níveis codificados e decodificados				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo (min)	2	4,9	9	13,2	16
Temperatura (°C)	65	71,1	80	88,9	95
Volume de água (mL)	100	140,5	200	259,5	300

Para o preparo das bebidas, foram pesados 2 g de chá, quantidade correspondente ao conteúdo aproximado de um sachê. Em seguida, a água quente foi adicionada e a infusão

permaneceu em repouso. Após o período de infusão, os chás foram imediatamente depositados em um banho de gelo, até atingirem a temperatura ambiente, transferidos para balões volumétricos e aferidos com água. O conteúdo do balão foi filtrado com papel filtro comum, seguido de filtragem em filtro de celulose de porosidade de 0,22 μm (Millipore, Brasil) e então injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a determinação do teor dos compostos estudados. Cada nível experimental foi realizado em triplicata verdadeira.

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com o auxílio do programa estatístico Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). Os modelos matemáticos gerados foram validados através de análise de variância (ANOVA) para a falta de ajuste e significância da regressão, ao nível de 95% de confiança. A ANOVA foi aplicada considerando a triplicata de preparo da bebida em cada nível experimental. Em seguida, para determinar a condição ótima de preparo da bebida de chá mate para a obtenção dos níveis máximos dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, foi utilizada a técnica de otimização simultânea de respostas de Derringer e Suich, estipulando-se um valor de desejabilidade para cada resposta e, posteriormente, combinando-se em uma desejabilidade global.

De acordo com os resultados obtidos na otimização multivariada, observou-se a necessidade de realizar testes univariados extrapolando o tempo de infusão ótimo indicado pela otimização. Assim, foram preparadas bebidas com tempos de infusão de 26, 36 e 46 minutos, e os demais parâmetros foram mantidos.

2.3 Instrumentação e condições cromatográficas

A separação dos ácidos clorogênicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo Agilent 1100, equipado com um sistema quaternário de bombas, injetor automático e detector de arranjo de diodos, todos da Hewlett Packard série 1100. Para realizar a separação foi empregada uma coluna de fase reversa C18 ACE (Suíça), com 100 mm X 4,6 mm e 3 μm de tamanho de partícula.

A análise cromatográfica consistiu em um sistema de eluição por gradiente linear, com a fase móvel constituída de ácido fórmico 0,1% (A)/metanol (B). O gradiente linear foi programado da seguinte forma: 13,9% de B a 40% de B em 39,4 minutos. A detecção foi realizada a 325 nm. A vazão da fase móvel foi mantida em 0,8 mL.min⁻¹, o volume de injeção foi 30 µL e a temperatura do forno da coluna foi fixada em 30 °C. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada comparando-se o tempo de retenção e o espectro de absorção dos picos das amostras com aqueles obtidos para os padrões analíticos, além de co-cromatografia. Os picos cromatográficos foram registrados e integrados com o auxílio do *software* Agilent Chemstation.

2.4 Quantificação do teor dos compostos fenólicos presentes nas folhas e talos de chá mate

Para avaliar a eficiência de extração dos ácidos clorogênico nas condições ótimas de preparo da bebida de chá mate, as folhas e talos de *Ilex paraguariensis* foram submetidos a um processo de extração exaustiva e o conteúdo total de cada ácido clorogênico estudado foi comparado aos níveis presentes na bebida pronta para consumo. A extração foi realizada conforme Meinhart e colaboradores (2010), com algumas modificações. Antes de ser submetida à extração, o chá mate foi moído para uma granulometria de 100 mesh em um moinho MARCONI TE 600 (São Paulo, Brasil). Foram adicionados 10 mL de metanol em 2 g de erva-mate e esta mistura foi submetida a agitação mecânica por 3 horas, período após o qual foi centrifugada por 10 minutos a uma velocidade de 3500 g. O sobrenadante foi separado e reservado, e ao conteúdo sólido remanescente foi adicionado mais 10 mL de metanol. A mistura permaneceu por mais uma hora sob agitação e, ao final, foi novamente centrifugada. Os extratos metanólicos provenientes das duas etapas de extração foram unidos em balão volumétrico de 25 mL e os volumes aferidos com metanol. Em seguida, os extratos foram filtrados com Milex (Millipore) 0,22 µm, adequadamente diluídos e submetidos a análise cromatográfica. A quantificação dos compostos presentes nestes extratos foi realizada através do mesmo método aplicado em extratos aquosos.

2.5 Aplicação em amostras

A condição ótima de preparo da bebida de chá mate encontrada através da otimização simultânea das concentrações dos ácidos clorogênicos estudados foi utilizada para avaliar os níveis desses compostos presentes em marcas comerciais de chá mate comercializados a granel (folhas soltas). Foram encontradas disponíveis no mercado, no período de outubro a novembro de 2012, 8 marcas de chá mate, das quais 2 marcas foram encontradas em 3 lotes, 3 marcas em 2 lotes e 3 marcas foram encontradas em apenas 1 lote, totalizando 15 amostras comerciais de chá mate analisadas. O tratamento estatístico foi realizado através do programa Statistica 7.0 (Statsoft, EUA). As concentrações médias obtidas para cada composto foram comparadas através de ANOVA e teste de Tukey para avaliar se houve diferença significativa entre as marcas e os lotes de comercialização (exceto para as amostras que estavam representadas por apenas um lote). As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

Para efeito de comparação, a bebida de chá mate também foi preparada de acordo com as instruções de tempo e temperatura de infusão presentes nos rótulos dos fabricantes das marcas adquiridas e os níveis obtidos para os compostos foram comparados aos verificados nas condições ótimas de preparo sugeridas pelo Derringer e Suich. Para estes experimentos, foi mantida a proporção massa/volume indicada pelo processo de otimização (2 g de chá para 300 mL de água). Como as recomendações de tempo e temperatura de preparo da bebida de chá mate variam entre fabricantes, foi realizado um levantamento dos procedimentos descritos nas embalagens de todas as marcas analisadas. Assim, a bebida foi preparada, a partir da infusão de 2 g de chá mate, com um tempo de infusão de 4 minutos (média aritmética das temperaturas descritas nas embalagens), a uma temperatura de 90 °C (determinada experimentalmente em laboratório, a partir das indicações recomendadas nas embalagens), utilizando 300 mL de água.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização das condições de preparo da bebida de chá mate

Na **Tabela 2** estão apresentadas as variáveis estudadas, bem como os níveis experimentais e os teores médios (n=3) dos ácidos clorogênicos presentes nas bebidas preparadas nas condições experimentais do planejamento composto central. Os dados expressam a média de uma triplicata verdadeira para cada nível experimental.

Tabela 2. Teor dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico nas condições experimentais do planejamento composto central.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Volume de água (mL)	5-CQ (mg)	3,4DQ (mg)	3,5DQ (mg)	4,5DQ (mg)
1	-1	-1	-1	11,48	0,85	1,52	2,58
2	-1	-1	1	11,43	0,85	1,64	2,74
3	-1	1	-1	11,37	0,90	1,62	2,76
4	-1	1	1	14,66	1,34	2,17	3,69
5	1	-1	-1	12,84	0,98	1,74	2,99
6	1	-1	1	13,62	1,07	1,99	3,28
7	1	1	-1	14,17	1,19	2,09	3,49
8	1	1	1	14,36	1,35	2,11	3,66
9	-1,68	0	0	11,91	0,88	1,58	2,70
10	1,68	0	0	15,04	1,26	2,16	3,66
11	0	-1,68	0	12,19	0,92	1,64	2,72
12	0	1,68	0	13,60	1,28	1,88	3,29
13	0	0	-1,68	13,52	1,09	1,89	3,29
14	0	0	1,68	13,76	1,22	1,92	3,31
15	0	0	0	13,66	1,09	1,92	3,28
16	0	0	0	12,74	1,02	1,80	3,10
17	0	0	0	13,64	1,10	1,88	3,28

Valores codificados dos níveis experimentais: Tempo = (tempo - 9)/4,15. Temperatura = (temp - 80)/8,9. Volume de água = (vol - 200)/59,9.

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico, 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5DQ = 3,5-dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Os valores representam a média de uma triplicata verdadeira, realizada em cada nível experimental.

Os coeficientes de regressão do modelo gerado para as respostas teor de ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico podem ser visualizados na **Tabela 3**, bem como os valores para a significância da regressão e ajuste dos modelos obtidos através da ANOVA. O tratamento estatístico indicou que o modelo linear não apresentou falta de ajuste para os dados, já que os valores de F obtidos para as respostas foram inferiores aos valores de $F_{crítico_{11,27,95\%}}$. A regressão para o modelo linear foi significativa ao nível de 95% de confiança e os resíduos mostraram-se aleatórios, sem indícios de heteroscedasticidade.

Dessa forma, os modelos matemáticos gerados puderam ser utilizados para realizar a otimização simultânea das respostas através da função de desejabilidade de Derringer e Suich, de modo a obter as condições ótimas de preparo do chá para a obtenção do teor máximo de ácidos clorogênicos.

Tabela 3. Validação dos modelos matemáticos: coeficientes de regressão, significância da regressão e testes para falta de ajuste

Respostas	Coeficientes			Significância da Regressão		Falta de ajuste	
	A	B	C	$\frac{MQ_R}{MQ_r}$	$F_{CRÍTICO_{3,38,95\%}}$	$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$	$F_{CRÍTICO_{11,27,95\%}}$
5CQ	1,02	0,32	0,30	18,32		1,22	
3,4DQ	0,11	0,097	0,060	31,34	2,82	1,46	2,09
3,5DQ	0,17	0,074	0,065	16,92		1,20	
4,5DQ	0,28	0,16	0,10	21,62		1,53	

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico, 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5DQ = 3,5-dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

A = tempo de infusão; B = temperatura de infusão; C = Volume de água

MQ_r = Média Quadrática devida à regressão; MQ_r = Média Quadrática devida ao resíduo; MQ_{faj} = Média Quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} = Média Quadrática devida ao erro puro.

O tempo de infusão constituiu o parâmetro de maior impacto sobre as respostas avaliadas, constatando-se que o aumento linear dessa variável resultou em uma bebida de chá mate com níveis mais elevados dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico. Provavelmente, o tempo de contato prolongado promoveu a migração de um maior número de moléculas desses compostos do chá mate para a bebida (VUONG *et al.*, 2009). O efeito positivo oriundo do aumento do tempo de infusão sobre os níveis de compostos fenólicos nas bebidas prontas para consumo já foi

relatado em estudos conduzidos para outros chás, como chá verde, chá preto e chá branco (PERVA-UZUNALIC *et al.*, 2006; RUSAK *et al.*, 2008; HORZIC *et al.*, 2009; KOMES *et al.*, 2010; VUONG *et al.*, 2011).

A temperatura da água da infusão foi outra variável muito importante para a eficiência da transferência dos ácidos clorogênicos para a bebida. Foi verificado que o aumento linear desse parâmetro promoveu a elevação dos teores dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico na bebida pronta para consumo. Diversos estudos já demonstraram que a extração dos ácidos clorogênicos em outras matrizes alimentícias foi favorecida pela elevação da temperatura (SOSULKI, McCLEARY, SOLIMAN, 1972; DIBERT, CROS, ANDRIEU, 1989; DE MARIA *et al.*, 1999; FARAH, DONANGELO, 2006; BUDRYN *et al.*, 2009; UPADHYAY, RAMALAKSHMI, RAO, 2011; ZHANG, YANG, LIU, 2009), efeito que pode ser atribuído a alta solubilidade apresentada por esses compostos em água quente, como já evidenciado por RODRIGUEZ DE SOLTILLO, HADLEY, HOLM, (1994), DE MARIA e colaboradores (1999) e FARAH, DONANGELO (2006). De acordo com Dibert, Cros e Andrieu (1989), o aumento na concentração de ácidos clorogênicos devido à elevação da temperatura pode ser explicado pelo aumento da difusividade dos ácidos clorogênicos ou pela maior permeabilidade desses compostos na célula vegetal quando a temperatura do solvente de extração é aumentada.

No que se refere ao volume de água empregada para o preparo da infusão, verificou-se que o aumento linear dessa variável favoreceu a extração dos ácidos clorogênicos a partir do chá mate, efeito que pode estar relacionado à diminuição da razão sólido-líquido da infusão. Quando o volume do solvente de extração (neste caso a água utilizada para o preparo da bebida) é aumentado e a proporção de sólido (representado pelo chá mate) é mantida, a quantidade de solvente disponível para interagir com a amostra é maior, o que promove aceleração da transferência de massa entre o sólido e o líquido, favorecendo a extração dos compostos da matriz (PRASAD *et al.*, 2009). Em adição a este efeito, quando comparados os ensaios que utilizaram os níveis inferiores dessa variável (-1, -1,68) àqueles que empregaram maiores volumes de água para o preparo das infusões (1, 1,68), observou-se que o resfriamento foi mais lento para estes últimos, isto é, ao final do tempo de infusão, as temperaturas para as bebidas preparadas nestes níveis experimentais eram mais elevadas.

Assim, para estes experimentos, o chá ficou exposto a uma temperatura favorável a extração por um período prolongado, favorecendo a obtenção de uma bebida com níveis de ácidos clorogênicos suplementados. Efeito similar na transferência de compostos fenólicos do chá verde para a bebida pronta para consumo já foi observado por Nishiyama e colaboradores (2010).

3.2 Otimização simultânea das respostas teor de ácidos clorogênicos

Ao empregar a ferramenta Derringer e Suich, foram estabelecidas desejabilidades a fim de que os algoritmos utilizem os modelos gerados para maximizar os teores de ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e do ácido 4,5-dicafeoilquínico na bebida de chá mate. Para tanto, foram construídas funções de desejabilidade lineares unilaterais para maximização dessas respostas, de acordo com as equações:

$$d_i = 0 \text{ se } C_i < C_{i\min}$$

$$d_i = \left(\frac{C_i - C_{i\min}}{C_{i\text{calvo}} - C_{i\min}} \right) \text{ se } C_{i\min} \leq C_i \leq C_{i\text{calvo}}$$

$$d_i = 1 \text{ se } C_i > C_{i\text{calvo}}$$

Onde: d_i = desejabilidade i entre 0 e 1

C_i = valor previsto pelo modelo estatístico para as i concentrações dos compostos

$C_{i\text{calvo}}$ = valores alvo para o teor dos compostos

$C_{i\min}$ = valor mínimo para o teor dos compostos

Os limites inferiores e superiores de desejabilidade para cada resposta otimizada foram determinados a partir das menores e maiores concentrações observadas no planejamento composto central. Foi estabelecido que os limites inferiores seriam os valores

das menores concentrações obtidas de cada composto no planejamento, enquanto os limites superiores seriam o dobro do valor das maiores concentrações alcançadas. O algoritmo encontrou 9 condições que satisfaziam os critérios estabelecidos, mas todas elas apresentavam variações muito pequenas entre si. As condições de desejabilidade utilizadas neste trabalho estão descritas na **Tabela 4**.

Assim, foi possível obter as condições ótimas de preparo da bebida de chá mate para a transferência dos níveis máximos dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, que foram: tempo de infusão de 16 minutos, com um volume de água de 300 mL a uma temperatura de 95°C. Os valores das respostas previstos pelo método de Derringer e Suich nestas condições experimentais apresentaram boa concordância com os valores obtidos experimentalmente, como pode ser observado na **Tabela 5**.

Tabela 4. Condições de desejabilidade empregadas na otimização simultânea das respostas.

Variável/ Resposta	Objetivo	Limite inferior	Limite superior	Importância
Tempo	Na faixa	-1,68	1,68	+++
Temperatura	Na faixa	-1,68	1,68	+++
Volume água	Na faixa	-1,68	1,68	+++
5CQ	Maximizar	10	30	+++
3,4DQ	Maximizar	0,7	3	+++
3,5DQ	Maximizar	1	5	+++
4,5DQ	Maximizar	2	6	+++

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico, 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5DQ = 3,5-dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Tabela 5. Teor dos compostos previstos pelo modelo e observados experimentalmente.

Resposta	Previsto (mg)	Observado (mg)
5-CQ	15,7	14,6
3,4DQ	1,5	1,6
3,5DQ	2,3	2,2
4,5DQ	4,0	3,8

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico, 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5DQ = 3,5-dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Os resultados destes testes estão apresentados na **Tabela 6**. O teste de hipótese (teste t) realizado para comparar os valores médios dos teores obtidos para cada composto nas condições ótimas de preparo da bebida aos verificados quando as bebidas foram preparadas com os tempos de infusão de 26, 36 e 46 minutos, indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre o teor de nenhum dos compostos presentes no chá mate pronto para consumo, em um nível de 95% de confiança. Além disso, é importante considerar que períodos de infusão muito longos não possuem viabilidade prática, uma vez que não representam a forma de preparo usualmente realizada pelo consumidor. Portanto, o tempo de infusão de 16 minutos foi utilizado para aplicação em amostras. A **Figura 1** apresenta o cromatograma da bebida de chá mate preparadas nas condições ótimas indicadas pelo programa estatístico.

Tabela 6. Resultados do efeito de extrapolação do tempo de infusão do chá mate sobre a concentração dos ácidos clorogênicos presentes nas bebidas prontas.

Tempo (min)	CONCENTRAÇÃO (mg em 300 mL)			
	5CQ	3,4CQ	3,5CQ	4,5CQ
16	14,62±0,45	1,58±0,04	2,18±0,17	3,76±0,12
26	15,45±0,13	1,75±0,05	2,15±0,26	3,86±0,13
36	14,93±0,35	1,93±0,09	1,65±0,14	3,70±0,22
46	15,73±0,63	1,72±0,05	2,46±0,08	4,03±0,12

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico; 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5DQ = ácido 3,5 – dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

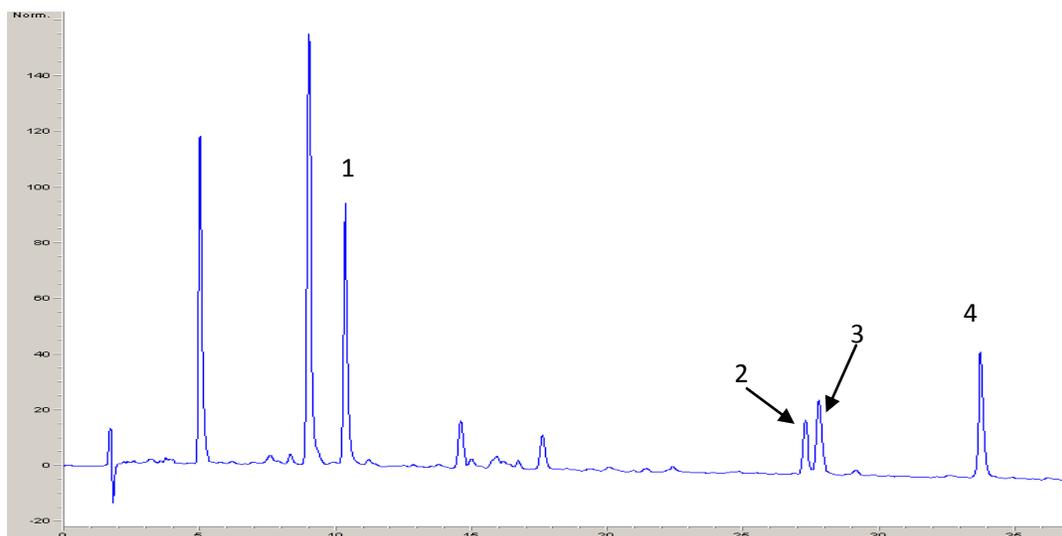


Figura 1. Perfil cromatográfico da bebida de chá mate obtida nas condições ótimas de preparo indicadas pelo Derringer e Suich. 1) ácido 5-cafeoilquínico 2) ácido 3,4-dicafeoilquínico 3) ácido 3,5-dicafeoilquínico 4) ácido 4,5-dicafeoilquínico.

3.3 Conteúdo total de compostos fenólicos presentes nas folhas e talos do chá mate e porcentagem transferida para as bebidas prontas para consumo

Na **Tabela 7** estão expressas as porcentagens extraídas dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5 – dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico nas condições ótimas de preparo da bebida de chá mate em relação ao conteúdo total desses compostos presente nas folhas e talos tostados de *I. paraguariensis*, bem como as concentrações obtidas destes compostos nas bebidas preparadas utilizando-se o modo indicado nas embalagens de comercialização.

As concentrações encontradas para os compostos estão em concordância com os resultados obtidos por Marques e Farah (2009). A partir dos dados da tabela, é possível inferir que o 5-cafeoilquínico constituiu o ácido clorogênico presente em maior quantidade no chá mate, resultado que está de acordo com Marques e Farah (2009) e Bastos e colaboradores (2005). Observa-se ainda que este composto apresentou a maior eficiência de extração, já que 94% do conteúdo total de ácido 5-cafeoilquínico presente no chá mate foi

transferido para a bebida. Este resultado pode ser explicado pela alta solubilidade do ácido 5-cafeoilquínico em água quente, sendo facilmente transferido da matriz alimentícia para a água sob temperatura de fervura, como relatado por De Maria e colaboradores (1999). Marques e Farah (2009) obtiveram uma eficiência de extração a partir do chá mate similar para o ácido 4,5-dicafeoilquínico (49%) e para o ácido 3,5-dicafeoilquínico (51%), porém, muito inferior para os ácido 3,4-dicafeoilquínico e 5-cafeoilquínico (10% e 44%, respectivamente).

O nível dos ácidos clorogênicos presentes nas bebidas preparadas de acordo com as instruções do rótulo (4 minutos de infusão a 90°C), bem como as porcentagens transferidas destes compostos do chá mate para a bebida, foi inferior ao verificado para as bebidas preparadas nas condições ótimas, demonstrando que o aumento do tempo e da temperatura da água de infusão promoveu maior eficiência de extração. O emprego das condições ótimas no preparo das bebidas de chá mate possibilitou um acréscimo no teor de 20% para o ácido 5-cafeoilquínico, 14% para o ácido 3,4-dicafeoilquínico, 7% para o ácido 3,5-dicafeoilquínico e 11% para o ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Tabela 7. Eficiência de extração dos ácidos clorogênicos no ponto ótimo de preparo da bebida obtida a partir de 2 g de chá mate.

Composto	Concentração* exaustiva	Concentração** no ponto ótimo	% Extraída	Concentração** instruções do rótulo	% Extraída
5CQ	15,49±1,09	14,62	94%	11,71±0,15	74%
3,4DQ	2,97±0,06	1,58	53%	1,15±0,00	38%
3,5DQ	6,10±0,95	2,18	35%	1,75±0,14	28%
4,5DQ	7,20±0,17	3,76	52%	3,01±0,13	41%

*Concentração em mg.2g⁻¹ **Concentração em mg em uma xícara de 300 mL de bebida de chá mate.

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico; 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5DQ = ácido 3,5 – dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico.

3.4 Aplicação em amostras

As condições ótimas de preparo da bebida de chá mate para obtenção de máxima eficiência de extração dos ácidos clorogênicos foram aplicadas em amostras comerciais e os resultados estão apresentados na **Tabela 8**. O teor de ácido 5-cafeoilquínico em 300 mL de bebida de chá mate 5-cafeoilquínico variou entre $3,72 \pm 0,17$ mg e $31,06 \pm 8,75$ mg, o valor de ácido 3,4-dicafeoilquínico ficou entre $0,52 \pm 0,01$ mg e $6,17 \pm 0,99$ mg, o teor de ácido 3,5-dicafeoilquínico oscilou entre $0,33 \pm 0,043$ mg e $26,18 \pm 9,96$ mg, e o de ácido 4,5-dicafeoilquínico variou entre $0,80 \pm 0,02$ e $15,84 \pm 5,69$ mg.

Os resultados indicaram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no teor de ácidos clorogênicos entre as bebidas preparadas a partir de distintos lotes de uma mesma marca. Da mesma forma, quando comparadas entre si, o teor dos compostos apresentou variação significativa ($p < 0,05$) entre as bebidas obtidas a partir das marcas avaliadas. As diferenças significativas verificadas podem ser atribuídas às variações na composição das plantas devido a disparidades de condições de cultivo e de processamento (SHARMA, GULATI E RAVINDRANATH, 2005; LIN *et al.*, 2003; ASTILL *et al.*, 2001; HECK, MEJIA, 2007; ESMELINDRO *et al.*, 2004; MAZZAFERA, 1997; PAGLIOSA *et al.*, 2010).

Bastos e colaboradores (2005) avaliaram o teor de 5-cafeoilquínico presente em bebidas de chá mate preparadas a partir de diferentes marcas comerciais e observaram que o conteúdo desse composto presente em 180 mL de bebida foi de 16 mg, teor próximo ao encontrado para as bebidas preparadas a partir das marcas A, D e G. Marques e Farah (2009) determinaram o teor dos ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico em 200 mL de amostras comerciais de bebidas de chá mate e verificaram um teor que oscilou entre 3,78 e 7,1 mg, 0,44 a 1,51 mg, 0,63 a 2,10 mg, e 0,97 a 3,29 mg, respectivamente, valores que estão de acordo com os encontrados para as bebidas analisadas no presente estudo.

Quando comparadas às bebidas preparadas a partir de outros chás, como o chá verde, chá preto e chá branco, verifica-se que apenas o ácido 5-cafeoilquínico está presente na composição dessas bebidas e em concentrações até 10 vezes menores (MARQUES, FARAH, 2009). As bebidas de café, principais fontes de ácidos clorogênicos da dieta,

podem apresentar, em uma xícara de 200 mL, de 9 a 30 mg de ácido 5-cafeoilquínico, de 0,52 a 2,5 mg de ácido 3,4-dicafeoilquínico, de 0,51 a 1,6 mg de ácido 3,5-dicafeoilquínico e 0,57 a 1,4 mg de ácido 4,5-dicafeoilquínico (DUARTE, FARAH, 2011; TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2011). De acordo com os dados apresentados na **Tabela 8**, o consumo de 300 mL da bebida de chá mate pode corresponder aos níveis de ácidos clorogênicos presentes em 200 mL da bebida de café, corroborando com a ideia de que as bebidas derivadas da erva-mate constituem uma importante fonte de ácidos clorogênicos para a dieta.

Tabela 8. Concentração dos ácidos clorogênicos na bebida chá mate de amostras comerciais.

Marca	CONCENTRAÇÃO (mg.300 mL ⁻¹)				
	Lote	5CQ	3,4DQ	3,5DQ	4,5DQ
A	1	14,73±0,49 ^a	1,82±0,07 ^a	2,09±0,22 ^a	3,84±0,18 ^a
	2	12,41±0,13 ^b	1,43±0,07 ^b	1,79±0,02 ^{a,b}	2,87±0,04 ^b
	3	10,38±0,72 ^c	1,41±0,14 ^b	1,59±0,14 ^b	2,82±0,14 ^b
Média		12,51±2,18 ^a	1,55±0,23 ^a	1,82±0,25 ^a	3,17±0,57 ^a
B	1	6,96±1,50 ^a	0,89±0,18 ^a	0,75±0,24 ^a	1,47±0,26 ^a
	2	13,83±0,81 ^b	1,72±0,38 ^b	1,84±0,11 ^b	3,68±0,35 ^b
	3	7,36±0,53 ^a	0,78±0,02 ^{a,c}	0,74±0,11 ^{a,c}	1,48±0,12 ^{a,c}
Média		9,58±3,85 ^a	1,13±0,51 ^a	1,11±0,63 ^{a,A}	2,21±1,27 ^{a,C}
C	1	1,39±0,15 ^a	0,19±0,01 ^a	0,20±0,02 ^a	0,30±0,02 ^a
	2	8,63±0,39 ^b	1,70±0,18 ^b	1,13±0,47 ^b	2,78±0,08 ^b
	3	-	-	-	-
Média		5,01±3,97 ^b	0,95±0,84 ^a	0,67±0,59 ^{b,A}	1,54±1,36 ^{a,A,C}
D	1	12,21±0,45 ^a	1,90±0,16 ^a	1,73±0,09 ^a	3,45±0,23 ^a
	2	12,76±0,99 ^a	1,96±0,19 ^a	2,24±0,21 ^b	3,86±0,30 ^a
	3	-	-	-	-
Média		12,48±0,75 ^a	1,93±0,16 ^a	1,98±0,32 ^{a,B}	3,66±0,32 ^{a,B}
E	1	23,76±5,60 ^a	0,7±0,01 ^a	8,06±3,11 ^a	10,85±2,44 ^a
	2	38,36±0,51 ^b	11,64±0,10 ^b	44,31±0,92 ^b	20,84±0,38 ^b
	3	-	-	-	-
Média		31,06±8,75 ^c	6,17±0,99 ^c	26,18±9,96 ^c	15,84±5,69 ^c
F	1	3,72±0,17	0,52±	0,33±0,04	0,80±0,02
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
G	1	12,42±0,26	1,42±0,12	1,91±0,13	3,44±0,02
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
H	1	5,07±0,18	0,51±0,05	0,56±0,05	0,88±0,01
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-

5CQ = ácido 5-cafeoilquínico; 3,4DQ = ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5DQ = ácido 3,5-dicafeoilquínico; 4,5DQ = ácido 4,5-dicafeoilquínico. Letras minúsculas diferentes para o mesmo composto em uma mesma coluna, para os lotes, representam médias com diferença significativa a 95% de confiança. Letras minúsculas diferentes para o mesmo composto, em uma mesma coluna, para as médias, representam diferença estatística significativa em um nível de 95% de confiança.

4 CONCLUSÃO

A utilização do planejamento composto central foi uma ferramenta muito importante para avaliar a influência das variáveis estudadas sobre o teor dos ácidos clorogênicos em bebidas de chá mate. Os resultados obtidos nesse estudo indicaram que se o consumidor optar por preparar a bebida com o uso de água fervente estará favorecendo a obtenção da bebida contendo teores elevados de ácidos clorogênicos. Este estudo demonstrou a relevância da bebida de chá mate como uma importante fonte de ácidos clorogênicos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2012/12565-0), pelo auxílio financeiro à pesquisa e à CAPES pela concessão da bolsa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T.W.; OLIVEIRA K.A., FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.D.E.O.; RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, p. 2127–2133, 2009.

ARÇARI, D.P.; BARTCHEWSKY, W. JR.; SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; DEOLIVEIRA, C.C.; GOTARDO, E.M.; PEDRAZZOLI JR, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L.F.C.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRA, M.L. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, .v. 335, p. 110-115, 2011.

- ASTILL, C.; BIRCH, M.R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P.G.; MARTIN, P.T. Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5340-5347, 2001.
- ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27–36, 2005.
- BASTOS, D.H.M.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; SOARES, R.A.M.; TORRES, E.A.F.S. The chlorogenic acid and caffeine content of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farm Bonaerense**, v.24, n. 1, p. 91-95, 2005.
- BALLUS, C.A.; MEINHART, A.D.; BRUNS, R.E.; GODOY, H.T. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v.83, p. 1181-1187, 2011.
- BHATTACHARYA, U.; MUKHOPADHYAY, S. GIRI, A. K. Comparative antimutagenic and anticancer activity of three fractions of black tea polyphenols thearubigins. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n 7, p. 1122–1132, 2011.
- BELKAID, A.; CURRIE, J.C; DESGAGNÉS, J.; ANNABI, B. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell International**, v.6, n.7, 1-12, 2006.
- BOAVENTURA, B.C.B.; DI PIETRO, P.F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; MORAIS, E.C.M.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E.L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p.657-664, 2012.

BUDRY, G.; NEBESNY, E.; PODSEDEK, A.; **Zyrelwicz**, D.; MATERSKA, M.; JANKOWSKI, S.; JANDA, B. effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. **European food research technology**, p.913-922, 2009.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates –nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

CHO, A.S.; JEON, S.M.; KIM, M.J.; YEO, J.; SEO, K., CHOI, M.S., LEE, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 937–943, 2010.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; DE MARIZ E MIRANDA, L.S.; SALVADOR, E. Stability of 5-cafeoylquinic acid under different conditions of heating. **Food research international**, v.31, n. 6-7, p.475-477, 1998.

DIBERT, K.; CROS, E., ANDRIEU, J. Solvent extraction of oil chlorogenic acid from green coffee. Part II: kinetic data. **Journal of food engineering**, v. 10, p. 199-214, 1989.

FARAH, A. DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian journal of plant physiology**, v.18, n.1, p.23-36, 2006.

GAO, H. LIU, Z.; WAN, W.; QU, X. CHEN, M. Aqueous extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Phytotherapy research**, Published online in Wiley Online Library, 2012.

GUGLIUCCI, A; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, p. 339–344, 2009.

HORZIC, D.; KOMES, D.; BELSCAK, A.; GANIC, K. A.; IVEKOVIC, D.; KARLOVIC, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Food chemistry**, v. 115,. P. 441-448, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em Dezembro, 2012.

JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine.

KLEIN, G.A.; STEFANUTO, A.; BOAVENTURA, B.C.B.; DE MORAIS, E.C.; CAVALCANTE, L.S.; DE ANDRANDE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E.L. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: A pilot study. **Journal of the American college of nutrition**, v.30, n 5, p. 320-332, 2011.

KOMES, D.; HORZIC, D.; BELSCAK, A.; KOVACEVIC, K.; VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 43, p. 167-176, 2010.

LEE, K., LEE, J.S.; JANG, H.J.; KIM, S.M.; CHANG, M.S.; PARK, S.H.; KIM, K.S.; BAE, J.; PAE, J.W.; LEE, B.; CHOI, H.Y.; JEONG, C.H.; BU, Y. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. **European Journal of Pharmacology**, v.689, n. 1-3, p. 89-95, 2012.

MA, C.M.; KAWAHATA, T.; HATTORI, M.; OTAKE, T.; WANG, L.; DANESHTALAB, M. Synthesis, anti-HIV and anti-oxidant activities of caffeoyl 5,6-anhydroquinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 863–869, 2010. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n.4, p.728-733, 2003.

- MACKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B. The Role of Tea in Human Health: An Update. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2002.
- MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370–1376, 2009.
- MARTINS, F.; MARTINS, F.; SUZAN, A.J.; CERUTTI, S.M.; ARÇARI, D.P.; RIBEIRO, M.L.; BASTOS, D.H.; CARVALHO, P.O. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 527-532, 2009.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n 2, p. 380-385, 2006.
- MEINHART, A. D.; BIZZOTO, C.S.; BALLU, C.A.; RYBKA, A.C.P.; SOBRINHO, M.R.; CERRO-QUINTANA, R.S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H.T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 58, p.2188-2193, 2010.
- MULLEN, W.; NEMZER, B.; OU, B.; STALMACH, A.; HUNTER, J.; CLIFFORD, M.N.; COMBET, E. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59, p. 3754-3762, 2011.
- NAGENDRA, K.; YANG, E.; YI, C.; ZHAO, M.; JIANG, Y. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. **Innovative food science and emerging technologies**, v. 10, p. 155-159, 2009.

- NISETEO, T.; KOMES, D.; BELSC AK-CVITANOVIC, A.; HORZIC, D.; BUDEC, M. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. **Food Chemistry**, v. 134, p.1870-1877, 2012.
- NISHIYAMA, M.F.; M.A.F.COSTA; COSTA, A.M.; SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G.; BRACHT, CK.; PERALTA, R.M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 191-196, Maio 2010.
- PANG, J.; CHOA, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p.178-185, 2008.
- PEREIRA, D.F.; KAPPEL, V.D.; CAZAROLLI, L.H.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; GUESSER, S.M. DA SILVA, E.L.; SILVA, F.R.M.B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, p.868-877, 2012.
- PERVA-UZUNALIC´ A.; KERGET, M. S ˇ; KNEZ, Z. ; Weinreich , B; Otto, F.; Gruner, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chemistry**, v. 96, p. 597–605, 2006.
- PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M.A.; VERMILLION, K.; POTTS, G.; MEJIA, E.G. Dicafeoylquinic acids in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular nutrition food research**, v. 55, p. 1509-1522, 2011.
- RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKÍC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, V. 110, p. 852–858, 2008.

- SHIBATA, H.; SAKAMOTO, Y.; OKA, M.; KONO, Y. Natural antioxidant, chlorogenic acid protects against DNA breakage cause by monochloramine. **Bioscience biotechnology biochemistry**, v. 63, n. 7, p. 1295-1297, 1999.
- SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical nutrition**, v. 24, n. 3, p. 360-366, 2005.
- SOSULSKI, F.W.; McCLEARY,.; SOLIMAN, F.S. Diffusion extraction of chlorogenic acid from sunflower kernels. **Journal of foode science**, v.37, 1972
- SOUZA, M.F.F. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e relação com atividade biológica**. 147f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SUZUKI, A.; YAMAMOTO, N.; JOKURA, H.; YAMAMOTO, M.; FUJII, A.; TOKMITSU, I. SAITO, I. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of hypertension**, v. 24, n. 6, p. 1065-1073, 2006.
- TUOMILEHTO, J.; GANG, H.; BIDEL, S.; LINDSTROM, J.; JOUSILAHTI, P. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged finnish men and women. **Jama**, v. 10, p. 1213-1219, 2004.
- UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L.J.M. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food chemistry**, v. 130, p. 184-188, 2012.
- VUONG, Q.V.; GOLDING, J.B.; STATHOPOULOS, E.C.; NGUYEN, M.H.; ROACH, P.D. Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. **Journal of separation science**, n. 34, p. 3099-3106, 2011.

ZHANG, B.; YANG, R.; LIU, C.Z. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. **Separation and purification technology**, v. 62, p.480-483, 2008.

ZHU, K.; CORDEIRO, M.L.; JOCELYN, A.; ROBINSON JR., W.E.; CHOW, S.A. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. **Journal of virology**, p. 3309-3316, 1199.

CONCLUSÃO GERAL

As técnicas estatísticas multivariadas utilizadas neste trabalho foram úteis para alcançar a otimização do método de separação de 10 compostos fenólicos (ácidos gálico, siríngico, cafeico, ferrúlico, *p*-cumárico, 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico e rutina) em extratos aquosos de erva-mate. Além disso, realizar a otimização multivariada em matriz adicionada de padrão indicou ser uma boa alternativa para garantir a aplicabilidade do método em amostra real. O método foi validado e os resultados indicaram que este foi adequado para a determinação dos 10 compostos fenólicos em extratos aquosos de erva-mate.

Dentre os compostos fenólicos investigados neste trabalho, verificou-se que a erva-mate possui altas concentrações de compostos da família dos ácidos clorogênicos (ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e do flavonoide rutina.

Os extratos aquosos obtidos a partir da erva-mate moída grossa apresentaram maiores níveis de compostos fenólicos em comparação àqueles extraídos da erva-mate tradicional. O efeito significativo da temperatura da água sobre a transferência de compostos fenólicos foi verificado apenas para os extratos obtidos a partir da erva-mate moída grossa. O consumo de extratos de chimarrão obtidos a 95°C, embora tenham apresentado maiores concentrações de compostos fenólicos, não é recomendado. Além disso, o chimarrão pode ser preparado com temperaturas mais brandas (65°C, 75°C) e apresentar elevado teor de compostos fenólicos.

No que se refere à bebida de chá mate, as ferramentas estatísticas utilizadas foram importantes para alcançar a otimização das condições de preparo desta bebida, estabelecendo condições de preparo viáveis para o uso do consumidor. Os resultados indicaram que se o consumidor desejar obter o máximo de extração de ácidos clorogênicos, o preparo da bebida a partir de chá mate com água sob fervura é o mais indicado.

Quando comparadas a outras bebidas fontes potenciais de ácidos clorogênicos, como o café, os extratos aquosos de chimarrão e da bebida de chá demonstraram ser uma excelente fonte alternativa desses compostos, apresentando níveis correspondentes ou mais

elevados para um mesmo volume de extrato ingerido. Este estudo apresentou dados inéditos acerca da composição química dos extratos aquosos de chimarrão e da bebida de chá mate ingeridos pelo consumidor e demonstrou a relevância dessas bebidas como fonte de compostos fenólicos de baixo custo.