

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE METILXANTINAS E POLIFENÓIS DA
ERVA-MATE PRODUZIDA PARA MATCHÁ.

TAÍS KLEIN

Porto Alegre, 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

TAÍS KLEIN

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE METILXANTINAS E POLIFENÓIS DA
ERVA-MATE PRODUZIDA PARA MATCHÁ.

Trabalho de conclusão de curso apresentado
junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do
Curso de Química Industrial, como requisito parcial
para a obtenção de grau de Química Industrial.

Prof. Dra. Rosângela Assis Jacques
Orientador

Porto Alegre, 2021.

CIP - Catalogação na Publicação

Klein, Taís

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE METILXANTINAS E
POLIFENÓIS DA ERVA-MATE PRODUZIDA PARA MATCHÁ / Taís
Klein. -- 2021.

47 f.

Orientadora: Rosângela Assis Jacques.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Erva-mate. 2. Cromatografia líquida. 3.
Metilxantinas. 4. Polifenóis. 5. Matchá. I. Jacques,
Rosângela Assis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A professora Rosângela Assis Jacques e a sua equipe de alunos e pesquisadores, em especial ao doutorando Allan Polidoro por toda ajuda e colaboração prestada no desenvolvimento desse trabalho.

A empresa Inovamate, e a sua proprietária Ariana Maia pela concessão das amostras, apoio técnico e discussões a respeito desse produto tão versátil, a ervamate.

Aos professores e colegas do curso de química da UFRGS, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado.

E principalmente a minha família, em especial ao meu marido Filipe Rigon, pelo suporte e paciência nesses últimos cinco anos, e aos meus dois filhos Antônio (5 anos) e Miguel (1 ano), que este trabalho sirva de exemplo e de alguma fonte de inspiração para a vida.

RESUMO

A erva-mate é um produto muito versátil, podendo ser consumida e processada de diversas formas. Atualmente o mercado oferece várias propostas de produtos à base de erva-mate para o consumidor, uma delas é a erva-mate produzida para matchá, que possui etapas em seu beneficiamento industrial diferentes da erva-mate produzida para chimarrão. Sabe-se que composição fitoquímica da erva-mate é rica em alguns compostos, principalmente as metilxantinas, na forma de cafeína e teobromina e polifenóis na forma de ácido clorogênico e flavanoides, como a rutina. Nesse trabalho foram extraídos esses compostos, que também fazem parte da composição fitoquímica da erva-mate para matchá, utilizando a técnica de extração assistida por ultrassom, e em seguida foram quantificados por HPLC utilizando o método de calibração externa com padrões analíticos. Foi realizada uma comparação entre as concentrações dos compostos encontrados na erva-mate para matchá, com a erva-mate tradicional para chimarrão utilizando o mesmo método de análise. Os resultados mostram concentrações superiores em todos os compostos analisados na erva-mate para matchá, quando comparados a erva-mate para chimarrão. O composto encontrado em maior concentração na erva-mate para matchá foi o ácido clorogênico, seguido da rutina, cafeína e teobromina. A rutina, por sua vez, obteve a maior proporção quando comparada a erva-mate para chimarrão, chegando a concentrações 8,4 vezes superiores na erva-mate para matchá. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio dos testes de ANOVA e Tuckey. Diferenças significativas nas concentrações foram encontrados para os compostos ACG e rutina, na comparação da erva-mate para matchá com as ervas-mates para chimarrão analisadas. A concentração de teobromina não obteve diferença significativa na comparação do conjunto de amostras analisada, diferentemente da concentração de cafeína, que obteve diferença significativa.

Palavras-chave: erva-mate matchá; metilxantinas; polifenóis; cromatografia líquida.

ABSTRACT

Yerba mate is a very versatile product that can be consumed and processed in different ways. Currently, the market offers several proposals for products based on yerba mate for the consumer, one of them is the yerba mate produced for matchá, which has stages in its industrial processing that are different from the yerba mate produced for chimarrão. It is known that yerba mate's phytochemical composition is rich in some compounds, mainly methylxanthin, in the form of caffeine and theobromine, and polyphenols in the form of chlorogenic acid and flavonoids, such as rutin. In this work, these components, which are also part of the composition of yerba mate for matchá, were extracted using the ultrasound-assisted extraction technique, after which they were quantified by HPLC using external calibration. A comparison was made between the concentrations of the compounds found in yerba mate for matchá, with the traditional yerba mate for chimarrão using the same method of analysis. The results show higher concentrations in all compounds analyzed in yerba mate for matchá, when compared to yerba mate for chimarrão. The compound found in the highest concentration in yerba mate for matcha was chlorogenic acid, followed by rutin, caffeine and theobromine. Rutin, in turn, had the highest proportion when compared to mate for chimarrão, reaching concentrations 8.4 times higher than mate for matcha. Statistical analysis of the results was performed using ANOVA and Tuckey tests. Significant differences in concentrations were found for the compounds ACG and rutin, in the comparison of the mate herb for matcha with the mate herb for chimarrão analyzed. The theobromine concentration did not show a significant difference when comparing the analyzed sample, unlike the caffeine concentration, which showed a significant difference.

Keywords: yerba mate; matcha; methylxanthines; polyphenols; liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Erva-mate produzida para matchá	14
Figura 2. Diagrama de bloco do processo produtivo do matchá de erva-mate realizado pela empresa Inovamate	18
Figura 3. Fórmula estrutural da teobromina e cafeína, principais xantinas encontradas na erva-mate	21
Figura 4. Estruturas químicas do ácido clorogênico (ACG) e seus isômeros.....	22
Figura 5. Estrutura da rutina.....	23
Figura 6. Curva de calibração dos padrões de teobromina, cafeína, ACG e rutina..	32
Figura 7. Extratos obtidos da erva-mate para matchá a partir de extração por ultrassom.....	33
Figura 8. Cromatograma da amostra de erva-mate para matchá, evidenciado a separação dos picos em 272nm. 1- Teobromina 2- Cafeína.....	34
Figura 9. Cromatograma da amostra de erva mate para matchá, evidenciado a separação dos picos em 326nm. 3-ACG.....	34
Figura 10. Cromatograma da amostra de erva mate para matchá, evidenciado a separação dos picos em 354nm. 4- Rutina	35
Figura 11. Cromatograma evidenciando os picos de separação dos compostos nos 3 comprimentos de onda em estudo (272, 326 e 354nm) da amostra de erva-mate para matchá.	35
Figura 12. Gráfico comparativo da concentração dos compostos teobromina, cafeína, ACG e rutina na erva-mate para matchá, erva-mate para chimarrão Premium e erva-mate para chimarrão tradicional.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informação nutricional da erva-mate para matchá.	19
Tabela 2. Parâmetros avaliados e resultados obtidos para as curvas de calibração	31
Tabela 3. Concentração dos compostos da erva-mate para matchá e figuras de mérito avaliadas.	36
Tabela 4. Comparativo da média da concentração dos compostos da erva-mate para matchá com a erva-mate para chimarrão Premium e a erva-mate para chimarrão Tradicional.	37
Tabela 5. Resultados estatísticos do teste ANOVA	39
Tabela 6. Resultados do teste estatístico de Tuckey	40
Tabela 7. Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACG – Ácido clorogênico

ANOVA – Análise de variância

DAD UV/VIS – Detector de arranjo de diodos ultravioleta/visível

Dms – Diferença mínima significativa

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência

HPTLC – Cromatografia Líquida em camada delgada de alta eficiência

HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

tr – tempo de retenção

UHPLC - Cromatografia Líquida de ultra-alto desempenho

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 O PRODUTO: ERVA-MATE PARA MATCHÁ.....	13
3.2 O CENÁRIO DO MERCADO BRASILEIRO DA ERVA-MATE	14
3.3 ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DA ERVA-MATE PARA MATCHÁ.....	15
3.3.1 Principais etapas do processo produtivo para produção de erva- mate para matchá	16
3.3.1.1 Colheita da erva mate e recebimento da matéria prima	16
3.3.1.2 Sapeco ou branqueamento.....	16
3.3.1.3 Secagem.....	16
3.3.1.4 Moagem grossa	17
3.3.1.5 Moagem em moinho de pedra de granito	17
3.3.1.6 Tamisação	17
3.3.1.7 Embalagem e expedição	17
3.4 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA ERVA-MATE	18
3.4.1 Metilxantinas	19
3.4.1.1 Cafeína	20
3.4.1.2 Teobromina.....	21
3.4.2 Polifenóis	21
3.4.2.1 Ácido clorogênico	21
3.4.2.2 Flavonoides	22
3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	23
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE	25
4. METODOLOGIA	28
4.1 AMOSTRAGEM	28
4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	28

4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA, TEOBROMINA, ACG E RUTINA	29
4.3.1 Preparo dos padrões e curvas analíticas.....	29
4.3.2 Instrumentação e condições do método.....	29
4.4 VALIDAÇÃO.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6. CUSTOS DO PROJETO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate é um produto amplamente consumido no Brasil, principalmente na região sul. Tradicionalmente, é utilizada no preparo do chimarrão, bebida típica que é consumida na forma de infusão a quente, o qual deve ser servida na cuia. Outras aplicações da erva-mate são na preparação de alimentos (bolos, sorvetes), cosméticos, energéticos e até mesmo produtos de limpeza.

Pensando em desenvolver uma nova opção e diversificar os produtos à base de erva-mate, para seus consumidores, a empresa brasileira Inovamate, de Ilópolis, RS, desenvolveu o matchá de erva-mate.

O matchá original é uma bebida produzida a base da planta *Camellia sinensis*, muito apreciada na cultura oriental, mas que hoje é consumida no mundo inteiro. A proposta do matchá de erva-mate, é que o seu processamento industrial seja similar ao processo de produção do matchá tradicional contudo, utilizando a erva-mate como matéria prima.

Embora a matéria prima utilizada para a elaboração do matchá de erva-mate seja a mesma do que a da erva-mate para chimarrão, por possuir diferentes etapas de produção, o produto final do beneficiamento do matchá, possui características particulares e distintas.

Sabe-se que muitos compostos fitoquímicos estão presentes em plantas superiores, como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Nos últimos anos, inúmeros pesquisadores trabalharam para caracterizar e quantificar esses compostos, entre eles as xantinas e os polifenóis, que chamam a atenção por demonstrarem propriedades estimulantes e antioxidantes, benéficas à saúde humana.

Nessa perspectiva, esse trabalho buscou realizar uma caracterização inicial da erva-mate para matchá, no que diz respeito a sua composição fitoquímica. A técnica escolhida para tanto foi a extração assistida por ultrassom, seguida da separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e quantificação utilizando padrões analíticos.

Nesse trabalho foram extraídos e quantificados os principais compostos bioativos da erva-mate já descritos na literatura como cafeína, teobromina, rutina e ácido clorogênico

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar a quantificação dos componentes fitoquímicos, como as metilxantinas e polifenóis, de um produto derivado da erva-mate, o matchá de erva-mate.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair as metilxantinas e polifenóis do matchá de erva-mate, através de extração assistida por ultrassom;
- Quantificar as metilxantinas cafeína e teobromina e os polifenóis na forma de ácido clorogênico e flavonoides, como a rutina pelo método de cromatografia líquida (HPLC), utilizando o método de calibração externa com o uso de padrões analíticos;
- Comparar os resultados obtidos para o matchá com os resultados da erva-mate processada pelo método tradicional para chimarrão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O PRODUTO: ERVA-MATE PARA MATCHÁ

Originalmente Matchá (chá verde moído) é um chá nativo do Japão, produzido através de brotos verdes da planta *Camellia Sinensis*. Refere-se a um pó fino e peneirado, inserido diretamente na tigela de cerâmica. A água é aquecida separadamente e misturada na tigela com um batedor de bambu. O resultado é uma bebida com espuma, o que a torna delicada e aerada. O chá produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* é, depois da água, a segunda bebida não alcoólica mais consumida no mundo. ^{1,2}

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta da família Aquifoliacea, que cresce normalmente na América do Sul, havendo ocorrência de produção na região sul do Brasil, onde a espécie é considerada nativa. Possui vários constituintes em sua composição, entre eles as xantinas, que são conhecidos por serem anticancerígenos e antioxidantes. Os alcalóides vegetais cafeína e teobromina são importantes componentes ativos na erva-mate, derivados da xantina e também são conhecidos como metilxantinas³. Além desses compostos, também fazem parte de sua composição os polifenóis na forma de ácido clorogênico e os flavanoides, como a rutina. A erva-mate pode ser consumida de diversas formas, contudo e o chimarrão e as infusões em água quente são as mais utilizadas.

A erva-mate para matchá (Figura 1), é um produto artesanal, produzido a partir das variedades de *Ilex paraguariensis* nativas da região de Ilópolis, RS. Esse produto foi desenvolvido pela empresa Inovamate Indústria e Comércio de Erva-mate Ltda, que além da erva-mate para matchá, possui outras propostas de chás que utilizam a erva-mate como base da indústria.

A erva-mate para matchá passa por etapas de beneficiamento semelhantes aos da planta do matchá original, por isso a alusão ao nome, seu processo produtivo foi adaptado do processo de produção do matchá japonês, porém utilizando a erva-mate como matéria-prima, ao invés da *Camellia Sinensis*. É indicada para consumo em infusões a quente ou frio, preparado preferencialmente com água. Além de ser consumida como chá, a erva-mate para matchá, vem sendo utilizada na alta gastronomia, como no preparo de sobremesas e na produção de produtos

diferenciados como os chocolates gourmet, na linha de trufas da Chocolat Du Jour, inspirada em chás de diversas origens. Também foi introduzida na produção de mel de terroir da empresa Mbee, conferindo sabor herbal, apreciado por consumidores de mel artesanal.

Figura 1. Erva-mate produzida para matchá.



Fonte: Joyce Galvão, 2021.

Fonte: arquivo Inovamate, 2021.

3.2 O CENÁRIO DO MERCADO BRASILEIRO DE ERVA-MATE

O agronegócio brasileiro, abrangendo os segmentos de alimentos, fibras e energia renovável, é de suma importância para a economia do país, uma vez que corresponde a cerca de um terço do seu produto interno bruto (PIB), aproximadamente 40% das receitas de exportações brasileiras e quase 40% do total de empregos gerados no país.⁴

No que diz respeito a produção de erva-mate no Brasil, o dado mais recente que se tem disponível é de 2018, que segundo o IBGE, é de cerca de 540 mil toneladas de folha seca de erva mate ao ano. O Rio Grande do Sul é responsável por 48% da produção de folha verde de erva-mate com uma média de 277371 toneladas/ano no período de 2016-2018.⁵

Cerca de 96% do consumo da erva-mate no Brasil é destinada ao preparo do chimarrão e apenas 4% em chás e outros usos. O consumo per capita de erva-mate brasileiro, estimado em 1,2kg por ano.⁵

A partir desses dados, podemos evidenciar que o mercado brasileiro para o consumo de chás preparados a partir de erva mate é ainda pequeno, mas possui capacidade de expansão.

3.3 ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DA ERVA-MATE PARA MATCHÁ

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é a única matéria prima para produção da erva-mate para matchá, a sua composição é isenta de aditivos e conservantes. É produzida a partir de folhas de erva-mate fresca, que passam por um processamento distinto do da produção de erva-mate tradicional para chimarrão.

No processamento da erva-mate para chimarrão, em geral, as folhas de mate fresco, passam por vários estágios antes de estarem prontas para serem embaladas. O processo envolve branqueamento, secagem e envelhecimento geral do chá. As condições de processamento são muito variadas dependendo do produtor e do objetivo final para o estilo e sabor desejados para o produto.⁶

O processo produtivo da erva-mate para matchá, também envolve muitas dessas etapas, contudo a característica exclusiva do matchá, que confere propriedades distintas da erva-mate para chimarrão é a granulometria do pó, que deve ser na ordem de 300µm, objetivando assim a obtenção de um pó extremamente fino como produto final.

O principal equipamento, que é único do processo de produtivo do matchá, é o moinho de pedra de granito. A ele é atribuído a operação de moagem das folhas de erva-mate, etapa determinante para obtenção de um pó na granulometria desejada para o produto.

A produção de erva-mate para matchá é um processo artesanal, que leva em torno de dois dias para ser finalizado, sendo fundamental no decorrer do processo o controle da umidade do ar, que não deve exceder os 70%.

Embora a composição da erva-mate para matchá seja a mesma que a erva-mate preparada para o consumo convencional do chimarrão, estudos demonstram que variações do processo produtivo podem conferir propriedades distintas na composição e concentração dos principais compostos bioativos tradicionalmente encontrados no produto.

Variações dos compostos bioativos presentes na erva-mate são conhecidos por surgirem de diferentes formas, entre elas: matérias-primas, origem geográfica; processos de beneficiamento, como diferentes combinações de tempo e temperatura, moagem, proporção entre caules e folhas e tempo de envelhecimento.^{6,7,8}

3.3.1 Principais etapas do processo produtivo para produção de erva-mate para matchá

3.3.1.1 Colheita da erva-mate e recebimento da matéria prima

A erva-mate pode ser colhida durante todos os meses do ano, contudo as características químicas e nutricionais mudam de acordo com a época que for realizada a poda da planta, determinando dessa forma as características sensoriais e nutricionais do produto final.⁸

3.3.1.2 Sapeco ou branqueamento

A etapa de sapeco ou branqueamento consiste em passar rapidamente os ramos com folhas sobre as chamas do sapecador, em temperaturas de até 400°C. Isto porque nas folhas da erva-mate estão presentes enzimas polifenoxidase e peroxidase, que foram identificadas em 1928 por Senglet como sendo as responsáveis pelo escurecimento das folhas. Essas enzimas oxidam os compostos fenólicos ao retirar as folhas da planta e expô-las ao ar, escurecendo-a.⁸

3.3.1.3 Secagem

Após a inativação enzimática que ocorre na etapa de sapeco, a erva-mate passa pelo processo de secagem, responsável pela retirada da umidade. Nesse processo o material entra com 25% de umidade e sai com umidade em torno de 8 a 10%. Esta etapa é importante pois o excesso de umidade pode ocasionar deterioração microbiológica.⁸

3.3.1.4 Moagem grossa

É a etapa do processo, onde a erva é socada em grandes pilões de ferro, conhecidos como soque, pelo tempo que for necessário, de acordo com o padrão de moagem definido (mais fina ou grossa).

3.3.1.5 Moagem em moinho de pedra de granito

A moagem em moinho de pedra de granito, é a principal etapa que difere o processo de produção de erva-mate para matchá do processo convencional. No matchá, o produto passa pelo moinho de pedra granito pelo período de um dia, garantindo assim um sólido na forma de pó e de granulometria extremamente fina, que pode chegar à ordem de 300 μ m.⁹

3.3.1.6 Tamisação

Na tamisação ou peneiramento, ocorre a separação de uma mistura de materiais sólidos granulados de diversos tamanhos em duas ou mais porções, cada uma delas com maior uniformidade que a mistura original. É uma operação mecânica que ocorre por separação através de uma superfície perfurada de granulometria conhecida (Mesh), garantindo assim, uniformização e padronização ao produto.^{8,9}

3.3.1.7 Embalagem e expedição

Após concluído o processo de beneficiamento da erva-mate para matchá, o produto está pronto para ser embalado e expedido. A embalagem ideal é aquela que impede a passagem de luz e minimiza a entrada de ar. A rotulagem deve seguir as diretrizes e normas da RDC 359 da ANVISA. O prazo de validade do produto não deve exceder os 6 meses, em função da degradação das propriedades organolépticas como cor e sabor.⁹

Na Figura 2, encontra-se o diagrama de blocos do processo produtivo de beneficiamento das folhas de erva-mate para produção de erva-mate para matchá.

Figura 2. Diagrama de blocos do processo produtivo do matchá de erva-mate realizado pela empresa Inovamate.



Fonte: A autora, 2021.

3.4 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA ERVA-MATE

A composição química da erva-mate é muito complexa, apresentando metilxantinas, saponinas, taninos, vitaminas, minerais, substâncias aromáticas, ácidos graxos, terpenos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, entre outros compostos.^{3,7,8}

Em termos nutricionais, a erva-mate para matchá é rica em fibra alimentar, apresentando uma considerável porcentagem de valores diários remondáveis por porção, mas também possui carboidratos e proteínas, como é possível visualizar na Tabela 1.

Tabela 1. Informação nutricional da erva-mate para matchá.

Informação nutricional			
	Porção: 20g		
	100g	20g	% VD(*)
Valor energético	57kcal= 237kJ	11kcal=47kJ	2%
Carboidratos	39,3g	7,9g	3%
Açúcares Totais	1,5g	0,3g	NA
Açúcares adicionados	0,0g	0,0g	0%
Proteínas	4,7g	0,9g	2%
Gorduras totais	3,8g	0,8g	1%
Gorduras saturadas	0,1g	0,0g	0%
Gorduras trans	0,0g	0,0g	0%
Fibra Alimentar	39,4g	7,9g	32%
Sódio	0,8mg	0,2mg	0%
(*) % de valores diários fornecidos na porção			

Fonte: Ficha técnica Matchá de erva mate Inovamate

A composição dos compostos bioativos nas folhas de erva-mate pode ser influenciada por diferentes fatores, tal como variabilidade genética, condições ambientais, idade da folha, período de colheita e processo de beneficiamento, entre outros fatores.^{8,10}

Os alcalóides vegetais cafeína e teobromina são importantes componentes ativos na erva-mate, são derivados da xantina e também são conhecidos como metilxantinas. Têm em comum o efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, sendo a cafeína o representante mais potente.³

Os polifenóis estão presentes principalmente na forma de ácido clorogênico e seus isômeros e também na forma de flavonoides, como a rutina.

3.4.1 Metilxantinas

As metilxantinas ou apenas xantinas são uma classe de alcalóides purínicos encontrados em muitas plantas, chás, café e também chocolate. As xantinas mais

importantes, encontradas na erva-mate incluem a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina).^{6,8}

3.4.1.1 Cafeína

A cafeína é um composto químico hidrossolúvel de fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$, classificado como alcaloide e designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina. A cafeína ocorre naturalmente em sementes, folhas e frutas de diversas plantas, agindo como um pesticida natural. Na saúde humana, é uma substância utilizada com finalidade terapêutica e farmacológica. Por ser altamente solúvel em água, seu pico de concentração no sangue, em humanos ocorre de 30-40 minutos após a ingestão, e tem meia-vida de 2,5-5 horas. O metabolismo da cafeína ocorre em maior proporção no fígado, local onde existe maior produção de citocromo P450 1A2, enzima responsável pela metabolização desta substância.^{11,12,13}

A ingestão de cafeína está relacionada ao seu efeito ergogênico, definição atribuída ao mecanismo que atua na melhora do desempenho do exercício físico. Confere propriedades como a redução da fadiga e estimulação do sistema nervoso central, melhorando, por exemplo, o estado de vigília, humor, atenção e o tempo de reação nas práticas esportivas.^{13,14} Contudo, quando consumida em quantidades elevadas a cafeína, pode produzir efeitos colaterais como arritmia, excitação, irritação, insônia e acidez gástrica.¹⁴

A presença de cafeína na erva-mate, vem sendo objeto de estudo de diversos artigos. A erva-mate contém quantidade de cafeína que varia entre 0,2 - 2% (m/m).¹⁰

A análise quantitativa da cafeína, pode ser realizada de diversas formas, porém uma vasta literatura faz referência uso de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência, como será abordado em seguida.

3.4.1.2 Teobromina

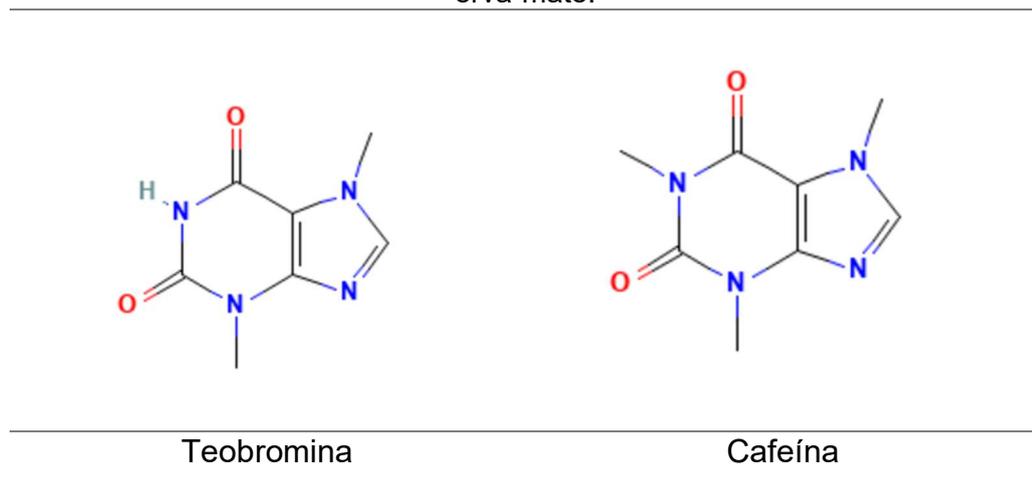
A teobromina é uma metilxantina bimetilada, que possui caráter menos básico que a cafeína podendo ser solubilizada em álcool, solventes orgânicos clorados e apenas parcialmente solúvel em água. Comumente, é encontrada no

chocolate, sendo a responsável pela sensação de bem-estar e prazer. Seu nome foi atribuído com base no fruto do cacau, o *Theobroma cacao*.^{10,12}

A teobromina é um composto considerado diurético, relaxante muscular e vasodilatador, diminui a pressão arterial e aumenta o fluxo sanguíneo no cérebro. Ao contrário da cafeína é um estimulante suave do sistema nervoso central e também tem algumas características antioxidantes. Ensaio farmacológicos confirmam que a teobromina é menos ativa do que a cafeína em humanos, por ser menos solúvel em água do que a cafeína, atinge o pico das concentrações sanguíneas 2–3 horas após a ingestão, e seu tempo de meia vida é de 7 a 12 horas.¹³

As fórmulas estruturais da cafeína e teobromina, são apresentadas na Figura 3.

Figura 3. Fórmula estrutural da teobromina e cafeína, principais xantinas encontradas na erva-mate.



Fonte: Pubchem, 2021.

3.4.2 Polifenóis

3.4.2.1 Ácido clorogênico (ACG)

Os polifenóis são moléculas que possuem o grupo aromático ligado a grupos hidroxila, são antioxidantes abundantes presentes na natureza, e encontram-se nas folhas de árvores, frutas e legumes.¹⁵

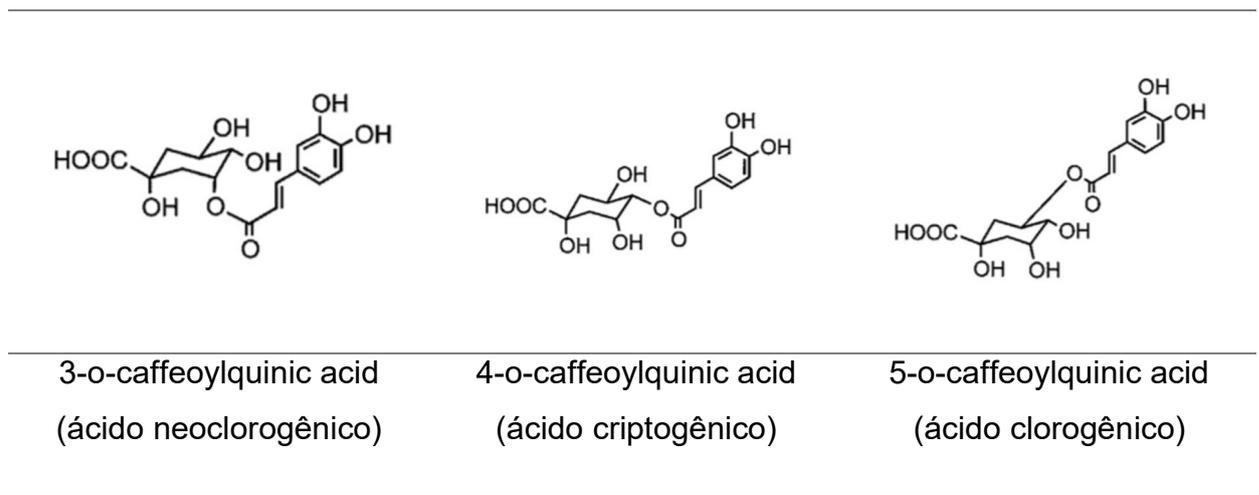
Estruturalmente, o ACG é um éster formado entre os ácidos caféico e l-quinico (ácido 5-O-cafeoilquinico). Os isômeros de ACG incluem o ácido 3-O-cafeoilquinico (ácido neoclorogênico) e o ácido 4-O-cafeoilquinico (ácido criptoclorogênico)

(Figura 4). ACG é um tipo de polifenol frequentemente presente em plantas superiores. É amplamente utilizado na medicina e em indústrias, como produto base para medicamentos e insumos. Também é empregado como aditivo em bebidas, cosméticos e alimentos.^{8,15,16,17}

Estudos apontam que extratos aquosos de erva-mate apresentam grande capacidade antioxidante, antiinflamatória, antiproliferativa, antimutagênica e antiobesidade, essas propriedades foram vinculadas ao alto teor de ácidos clorogênicos e seus isômeros presentes na planta.^{15,16}

Na literatura, foram encontrados valores entre 8–10% (m/m) de ACG (incluindo os compostos isoméricos) extraídos em base seca de erva-mate, contudo diferentes tipos de processo e de beneficiamento podem produzir mudanças no perfil e na concentração de compostos bioativos.¹⁵

Figura 4. Estruturas químicas do ACG e seus isômeros.



Fonte: BUTIUK *et al.*, 2016.

3.4.2.2 Flavanoides

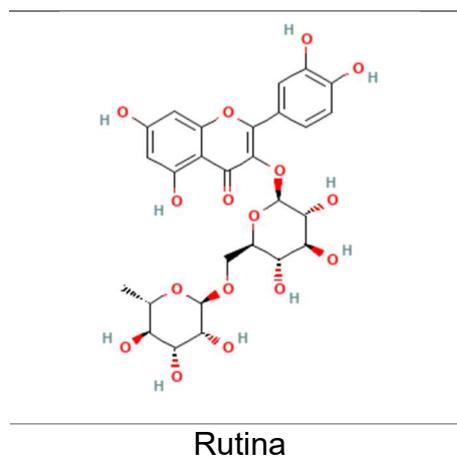
Os flavonóides, são um grupo de substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis, encontrados principalmente em frutas, vegetais, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chás e em vinhos.¹⁸

Os flavonoides, pertencem a uma classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular amplamente distribuídos no reino vegetal. São divididos em subgrupos dependendo das ligações entre os carbonos do anel e o seu grau de insaturação e

oxidação, essas características conferem propriedades distintas às suas moléculas. Entre os principais subgrupos de flavanoides estão: flavonóis, flavonas, isoflavonóis e antocianinas.¹⁸

A rutina, é classificada como um flavanol, que são os flavanóides que possuem um grupamento cetona, na sua estrutura química. Nesse subgrupo também estão presentes a quercitina e o kamperol. Os flavonóis têm um grupo hidroxila em posição 3 do anel C, que também pode ser glicosilado. A estrutura química da rutina, encontra-se na Figura 5.^{12,18}

Figura 5. Estrutura da rutina



Fonte: Pubchem, 2021.

3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Na literatura, várias técnicas têm sido descritas para extração de metilxantinas e polifenóis de matrizes sólidas, entre as mais usuais estão: extração aquosa a quente com refluxo de calor, extração assistida por microondas, fluido supercrítico, extração por ultrassom, entre outras.

O isolamento dos analitos alvo de uma matriz sólida é uma das etapas do processo analítico mais críticas, nela podem surgir problemas como a perda de analito ou contaminações durante o preparo da amostra. O método escolhido para extração deve levar em conta a seletividade e polaridade para os componentes de interesse, recuperação do analito, volume do solvente orgânico necessário, toxicidade do solvente, tempo de extração e número de etapas de *clean-up* requeridos após a

extração, além de outros parâmetros como presença de substâncias interferentes, temperatura e tamanho da molécula de interesse.^{8,19,20}

Os solventes mais utilizados para extração de compostos fenólicos e metilxantinas são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol e também as diferentes combinações entre eles.^{21,22}

A extração aquosa normalmente é realizada através do uso do aparelho de Soxhlet, em temperatura de refluxo de 90 °C por várias horas ou maceração com solvente por dias em temperatura ambiente. Esses métodos, que têm sido usados por muitas décadas, são demorados e mesmo quando a técnica é realizada utilizando solventes orgânicos, requerem quantidades relativamente grandes do produto.⁸

Outras tecnologias, propõem a extração de compostos bioativos da erva-mate através de extração com CO₂ supercrítico. A extração com fluido supercrítico é uma operação unitária que explora as propriedades do solvente acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão. Essa é uma opção de extração considerada ambientalmente correta, pois não utiliza solventes orgânicos, contudo necessita altas pressões de trabalho, normalmente em torno de 26MPa (256 atm), o que envolve alto gasto energético.²³ Uma opção, para reduzir o custo energético, foi proposta por Hegel, 2021 é a extração com CO₂ supercrítico utilizando etanol como co-solvente. De acordo com Hegel, a extração fornece alta seletividade e curto tempo de operação, apresentando bons resultados, especialmente para a cafeína, pois o etanol aumenta consideravelmente a solubilidade das metilxantinas.²³

Uma opção intermediária, é a extração assistida por ultrassom, que se baseia na ação de ondas mecânicas de baixa frequência, de 20 a 40Hz, às quais resultam na cavitação, fenômeno responsável pela formação e colapso de bolhas, que refletem em áreas pontuais de alta pressão e quando associadas a temperaturas relativamente altas, proporcionam um aumento na solubilidade do analito facilitando o processo de extração dos elementos em matrizes sólidas.²⁴

A extração assistida por ultrassom, promove a diminuição do tempo e o incremento na eficiência de extração, reduzindo as quantidades de solventes, tempo e energia. Além disso, é uma técnica classificada como um método de química analítica verde, que envolve o conceito de desenvolvimento sustentável, destinado a remover ou minimizar o impacto ambiental causado por metodologias analíticas.^{24,25}

Os humanos conseguem ouvir frequências na faixa de 16 a 18 kHz. O ultrassom são ondas com frequência superior a 20 kHz, e que por isso, são imperceptíveis ao ouvido humano. O ultrassom na frequência entre 20-40 kHz, que pode ser produzido por equipamentos típicos de laboratório, permite que energia acústica seja suficiente para que a cavitação seja produzida. Altas frequências, acima de 5 MHz, são incapazes de produzir o efeito da cavitação, pois em amplitudes de alta vibração, a fonte de ultrassom é incapaz de manter contato com o líquido utilizado na aparelhagem ao longo de todo o ciclo, reduzindo assim, a eficiência da cavitação e por consequência da extração.²⁵

A extração por ultrassom já foi utilizada em diversas amostras sólidas, Cotta, em 2009, por exemplo, utilizou a técnica para extrair hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados, através do uso de diferentes solventes, obtendo bons resultados.²¹

Em sementes de cacau e produtos à base de chocolate, Peralta em 2013, extraiu cafeína e teobromina com solvente aquoso a 80°C, utilizando ultrassom. Obteve eficiência de extração superior a 57,7% para a cafeína e 43,6% superior para a teobromina, quando comparado a extração convencional líquido-líquido somente sob agitação mecânica e sem o uso da técnica de ultrassom, para esses componentes.²⁶

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação física conduzida na fase líquida, onde os componentes (ou analitos) de uma amostra podem ser separados pela sua distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária (sorventes empacotados no interior da coluna). Por sua versatilidade, hoje, é largamente utilizada para determinação de diversas substâncias em alimentos, desde proteínas, ácidos orgânicos, vitaminas, açúcares, corantes, componentes fenólicos, conservantes, agrotóxicos, entre outros.^{27,28}

Estruturalmente, um cromatografo líquido é composto por uma bomba, injetor, coluna, forno e detector. A parte mais importante do equipamento é a coluna, é ela que permite a separação e resolução de compostos com base na seletividade e em seu desempenho. As colunas convencionais para HPLC são fabricadas de partículas

de sílica, cuja superfície é modificada por cadeias de alquil variando em comprimento de C4 a C18. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é denominada de cromatografia de fase normal. Na situação inversa, ou seja, quando a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente, a cromatografia recebe a denominação de cromatografia de fase reversa, como exemplo, fase estacionária, um hidrocarboneto, e fase móvel água, metanol ou acetonitrila.^{27,28,29}

O principal objetivo da técnica de HPLC é a separação dos analitos dos outros componentes da amostra, a fim de obter uma quantificação precisa de cada componente. Para tanto, é necessário que: i) a amostra seja solúvel na fase móvel, analitos insolúveis na fase móvel não podem ser analisados por HPLC; ii) para que a separação ocorra os analitos devem ficar retidos na fase estacionária e possuir diferentes tempos de retenção iii) A fase móvel controla a separação: as melhores condições do método são determinadas com base nos ajuste das quantidades e gradientes da fase móvel durante o tempo transcorrido de análise e iv) todo método analítico possui suas ressalvas e limitações, cabendo ao pesquisador os ajustes necessários para tanto.²⁹

As vantagens da técnica de HPLC frente a outras técnicas são: análise rápida e precisa, operação automatizada, detecção altamente sensível (que depende do equipamento utilizado), é adequada para diversos tipos de amostras e analitos. As limitações são: não possui detector universal, aplicável a todos os tipos de amostra e requer maiores treinamentos para operação.²⁹

A determinação de metilxantinas e polifenóis em amostras de erva-mate, pode ser realizada de diversas maneiras, contudo inúmeros estudos descrevem técnicas de cromatográfica líquida em seus trabalhos.

Na literatura, em geral, a HPLC é vastamente utilizada para a determinação de compostos bioativos presentes em matrizes complexas, mesmo em extratos contendo grande número de compostos bioativos e termicamente instáveis.¹⁰

Oeling utilizou a cromatografia líquida em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) com detector ultravioleta (UV) para a determinação simultânea de cafeína, teobromina e teofilina em diferentes alimentos. Analisou bebidas comercializadas na Alemanha, que utilizam erva-mate em sua composição e obteve concentrações de cafeína que variam entre 78 e 125mg L⁻¹.³

Kaltbach *et. al.*, em 2020 obteve bons resultados no desenvolvimento de métodos de alto rendimento para a avaliação de substâncias bioativas majoritárias, como cafeína, teobromina, compostos fenólicos e saponinas presentes em extratos de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) por meio de HPTLC. Avaliou também diferentes tipos de extração, utilizando extratos aquosos e metanólicos em diversas condições de temperatura, tempo e pH.⁷

Os polifenóis, como o ACG e seus isômeros também podem ser determinados isoladamente, como no estudo de Butiuk em 2016 que avaliou amostras de erva-mate em diferentes etapas do processo de beneficiamento, utilizando cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (DAD UV/VIS), por meio de extração aquosa a quente.¹⁵

Em outras amostras, como em pimenta verde e vermelha de origem orgânica, Rosa *et. al.* em 2020 publicou estudos sobre a determinação de ACG e outros compostos fenólicos como resveratrol, ácido cumárico, rutina, luteolina, quercitina entre outros, por meio da técnica de HPLC-DAD.³⁰

Giusti *et. al.* em 2017 identificou e quantificou, em amostras de 36 legumes como feijão, lentilha, grão-de-bico, ervilha e soja provenientes de diferentes países, 14 polifenóis e 2 antocianinas simultaneamente, usando HPLC-DAD entre eles ACG, ácido gálico, rutina, resveratrol, entre outros. O conteúdo total de polifenóis analisados variou de 3 mg kg⁻¹ (lentilha descascada) a 1630,5 mg kg⁻¹ (feijão).³¹

Com técnicas de tecnologia mais avançada, Ahmad *et. al.* (2020), determinou metilxantinas em amostras comerciais de café e chá via cromatografia líquida de ultra-alto desempenho (UHPLC). A UHPLC é usada como uma alternativa para HPLC, possuindo maior resolução cromatográfica, sensibilidade, menor uso de solvente e tempo de análise. O estudo também avaliou o efeito da variação da temperatura e da polaridade do solvente na extração de metilxantinas de diferentes amostras de chá e café, no intuito de desenvolver um método eficiente em termos de alto rendimento e tempo de análise.¹⁹

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

A amostra de erva-mate para matchá foi cedida pela empresa Inovamate Indústria e Comércio de erva-mate LTDA, de Ilópolis, RS. É comercializada pelo nome de Matchá Matequero, sendo classificada pelo o Ministério da Agricultura, como pó de erva-mate. Seu processo produtivo está descrito no item 3.2 desse trabalho, é comercializada em embalagem de 100g, sendo composta por um único ingrediente, as folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em pó de granulometria fina (300 μ m), sem adição de conservantes ou outros aditivos, como açúcares, ervas ou chás.

4.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

As extrações dos compostos foram realizadas em triplicata, utilizando um equipamento de banho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil) de frequência 40kHz, pesando-se cerca de 0,25g de amostra em balança analítica Ohaus modelo Adventurer (Pine Brook, EUA), utilizando 25mL de uma solução extrativa etanol:água, 43% de etanol (etanol de grau HPLC), na temperatura de 80°C, por 11,2 minutos, utilizando balão volumétrico. O método foi adaptado com modificações com base nos estudos de Santos (2018), que caracterizou os mesmos compostos bioativos em questão, a partir de resíduos do processamento de café, utilizando extração assistida por ultrassom.³⁴ Os extratos obtidos foram submetidos à filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 μ m, diluídos 1:4 com a solução extrativa (etanol:água) e analisados por HPLC-DAD. Para determinação do ACG a amostra foi reinjetada com diluição 1:20, para ajustar a concentração à curva de calibração.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA, TEOBROMINA, ACG E RUTINA

4.3.1 Preparo dos padrões e curvas analíticas

O conjunto de analitos foi identificado positivamente através do tempo de retenção obtido para cada padrão, sendo eles: teobromina (99% de pureza), cafeína (99% de pureza), ACG (ácido 5-cafeoilquínico 95% de pureza), rutina (95% de pureza), todos da marca Sigma-Aldrich.

A quantificação dos compostos foi realizada por meio de calibração externa, utilizando os mesmos padrões citados anteriormente.

As soluções dos padrões foram preparadas de forma isolada. Primeiramente foi preparada uma solução mãe de cada padrão na concentração de 50mg L⁻¹ para teobromina, 100mg L⁻¹ para cafeína, 50mg L⁻¹ para ACG e 150mg L⁻¹ para rutina. Posteriormente as alíquotas dessa solução foram diluídas de modo a obter a seguinte faixa de concentração: teobromina 0,5 a 5mg L⁻¹, cafeína: 10 a 100mg L⁻¹, ACG de 2 a 20mg L⁻¹ e rutina 20 a 150mg L⁻¹. Foram realizadas leituras em triplicada para cada ponto da curva, e a partir de média dos valores da área integrada, obtidos experimentalmente, foi possível construir a curva de calibração.

4.3.2 Instrumentação e condições do método

A separação e quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo 20-AD, com injetor automático, degaseificador de fase móvel DGU-20A3 forno de aquecimento CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M-20^a, que se encontra na sala CA 102, da central analítica da UFRGS.

Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna ZORBAX Bonus-PR (4,6 x 250mm x 5,5µm).

A ZORBAX Bonus-RP é utilizada em fase reversa, é estável em pH baixo e médio, possui um grupo polar de amidas incorporado a uma longa cadeia de alquil. Essa nova ligação reduz as interações entre os componentes básicos e o suporte de sílica, melhorando o formato de pico para os compostos básicos mais difíceis.³²

As condições do método foram as seguintes: fluxo: 0,7mL min⁻¹, temperatura do forno 29°C, volume de injeção 10µL. A fase móvel A utilizada foi água acidificada com 0,5% ácido fórmico e fase B acetonitrila grau HPLC acidificada com 0,5% de ácido fórmico. As fases foram desgaseificadas e filtradas em membrana de éster celulose 0,22µm antes de serem utilizadas. O gradiente de análise utilizado foi: no início 10% de B; 45 minutos 60% de B; 50 minutos 40% de B; 52 minutos 10% de B.

Os cromatogramas obtidos foram analisados e os picos cromatográficos integrados em três comprimentos de onda máximos, na faixa do UV: 272nm (máximo de absorção da cafeína e teobromina), 326nm (máximo de absorção do ACG) e 354nm (máximo de absorção da rutina).

4.4 VALIDAÇÃO

Os parâmetros de validação analisados foram linearidade ou coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.³³

Ambos os parâmetros de LQ e LD devem ser expressos em concentração.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através do método baseado nos parâmetros da curva analítica, conforme descrito por Ribani, *et. al.* utilizando Equação 1 e 2, respectivamente. Onde s é o erro-padrão relativo ao coeficiente linear da curva analítica e S é a média da inclinação da curva.³³

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad [1]$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad [2]$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de calibração, construídas a partir dos padrões, foram plotadas com base nos resultados experimentais da resposta do cromatógrafo (área integrada) e da

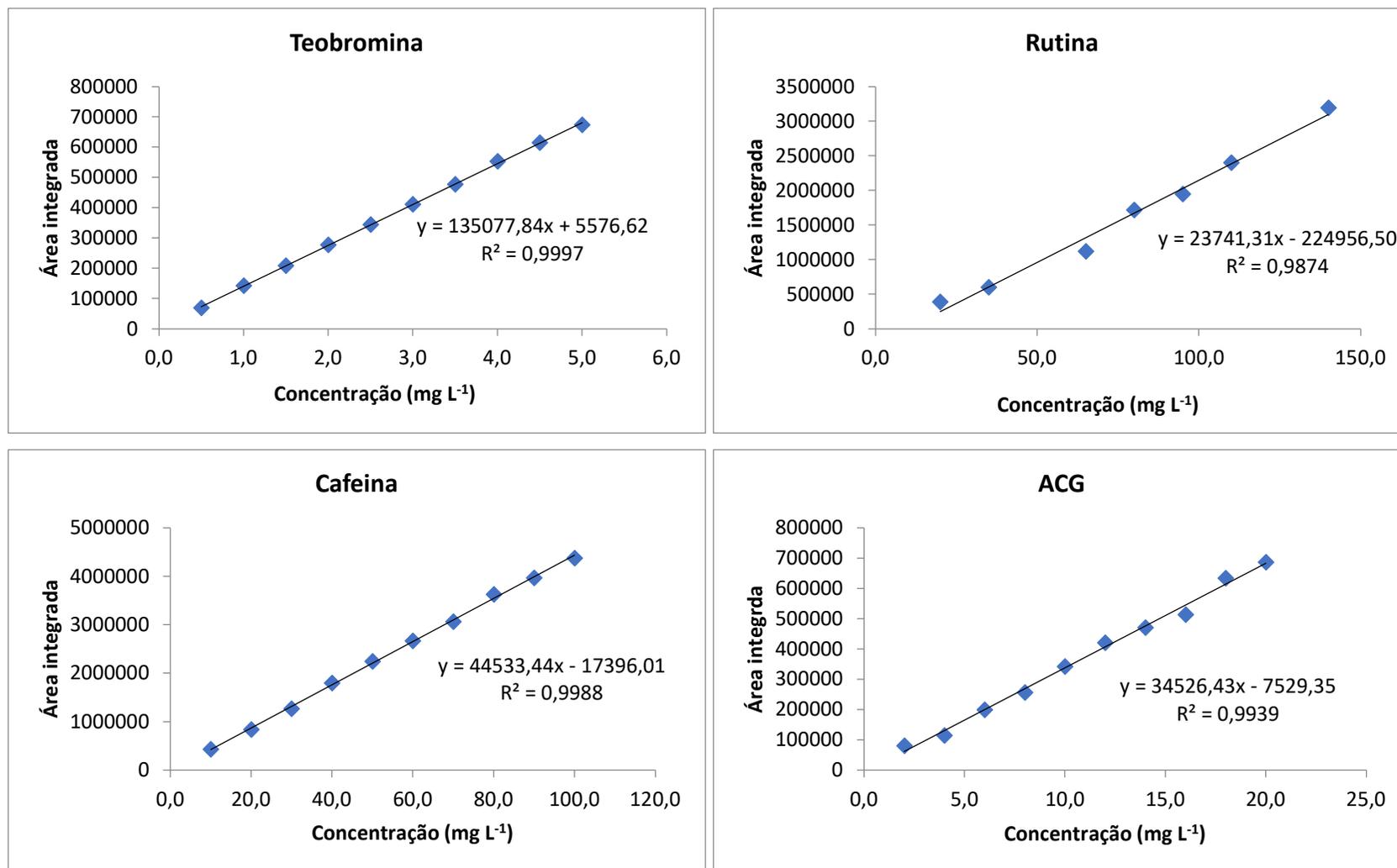
concentração da solução do padrão, expressa em mg L⁻¹, conforme a Figura 6. Na Tabela 2, encontram-se os dados referentes a linearidade da curva e os resultados dos parâmetros de validação.

Tabela 2. Parâmetros avaliados e resultados obtidos para as curvas de calibração

Composto	Tempo de retenção (min)	λ máximo (nm)	Intervalo de concentração (mg L⁻¹)	R²	LQ (mg L⁻¹)	LD (mg L⁻¹)
Teobromina	6,929	272	0,5 – 5	0,9997	0,01	0,004
Cafeína	10,738	272	10-100	0,9988	0,17	0,06
ACG	16,210	326	2-20	0,9939	0,60	0,20
Rutina	20,788	354	20-150	0,9874	1,24	0,41

Fonte: A autora, 2021.

Figura 6. Curva de calibração dos padrões teobromina, cafeína, ACG e rutina.



Fonte: A autora, 2021.

O método avaliado apresentou boa linearidade ($r^2 > 0,99$) nos intervalos de concentração estudados, o que atende os parâmetros da Anvisa ($r^2 > 0,99$) exceto para o composto rutina que apresentou, coeficiente de determinação abaixo de 0,99, mas, que ainda assim, está de acordo com os parâmetros aceitos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) ($r^2 > 0,90$).³³

Os resultados para limite de detecção e quantificação obtidos a partir dos dados da curva analítica, são considerados adequados para a determinação dos compostos nas amostras estudadas, pois as concentrações nas amostras avaliadas são superiores aos limites determinados.

Os extratos da amostra de erva-mate para matchá (diluídos 1:4) obtidos através da extração assistida por ultrassom apresentaram-se límpidos e com coloração verde vivo, mantendo assim as características do produto original, conforme apresentado na Figura 7.

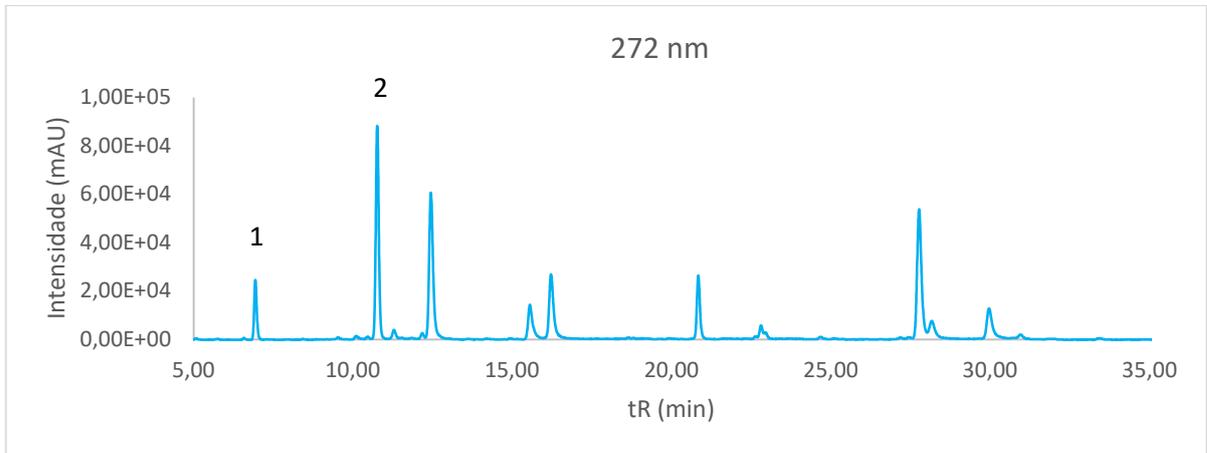
Figura 7. Extratos obtidos da erva-mate para matchá a partir de extração por ultrassom.



Fonte: A autora, 2021.

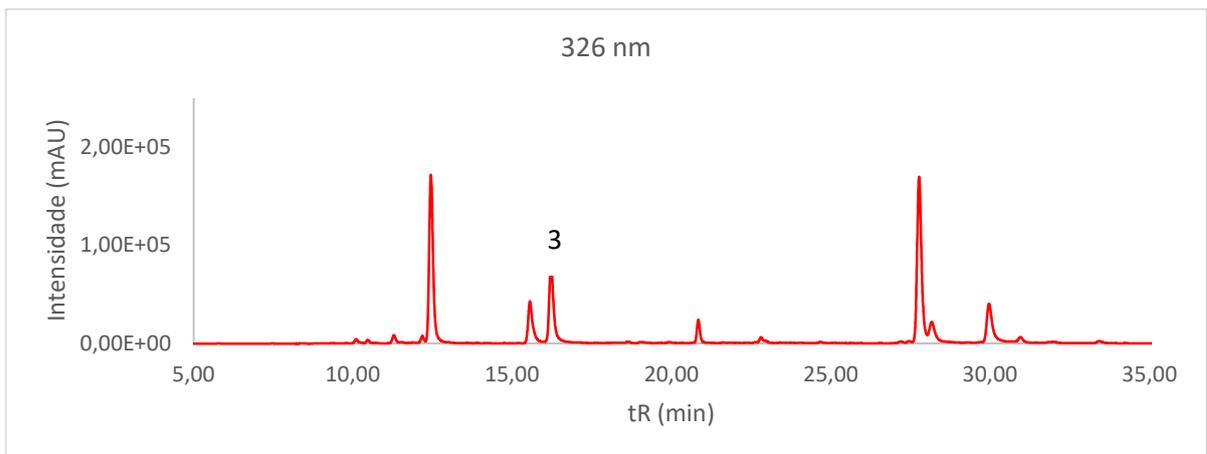
A amostra injetada, apresentou boa separação dos compostos, mostrando picos isolados e de boa resolução. Todos os compostos analisados (teobromina, cafeína, ACG e rutina) foram identificados positivamente na amostra, comparando a presença do pico com o tempo de retenção (t_r) do padrão, conforme as Figuras 8,9 e 10. A Figura 11 mostra a sobreposição dos três cromatogramas em diferentes comprimentos de onda, a título de comparação. A quantificação foi realizada utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada padrão e a respectiva curva de calibração.

Figura 8. Cromatograma da amostra de erva-mate para matchá, evidenciado a separação dos picos em 272nm. 1- Teobromina 2- Cafeína



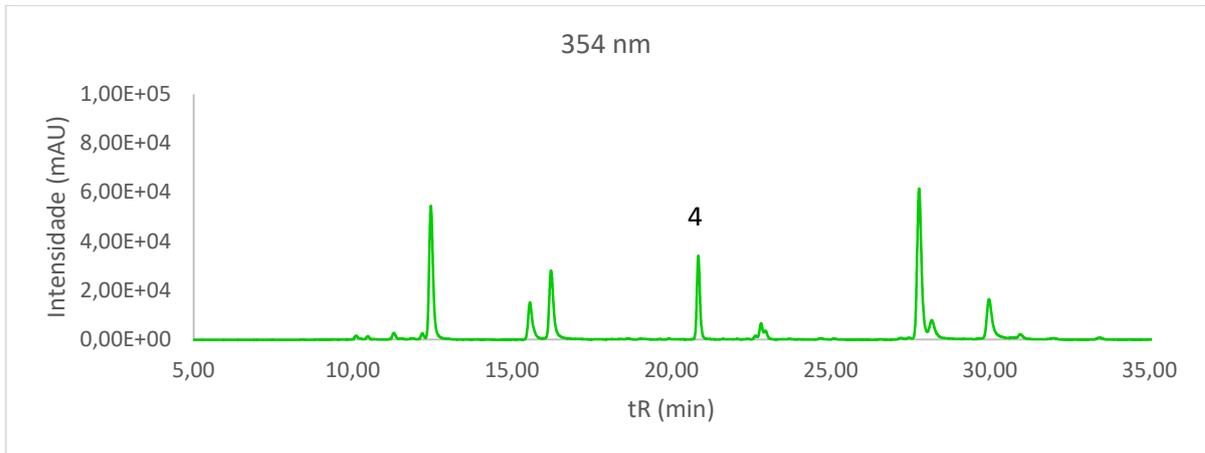
Fonte: A autora, 2021.

Figura 9. Cromatograma da amostra de erva mate para matchá, evidenciado a separação dos picos em 326nm. 3-ACG



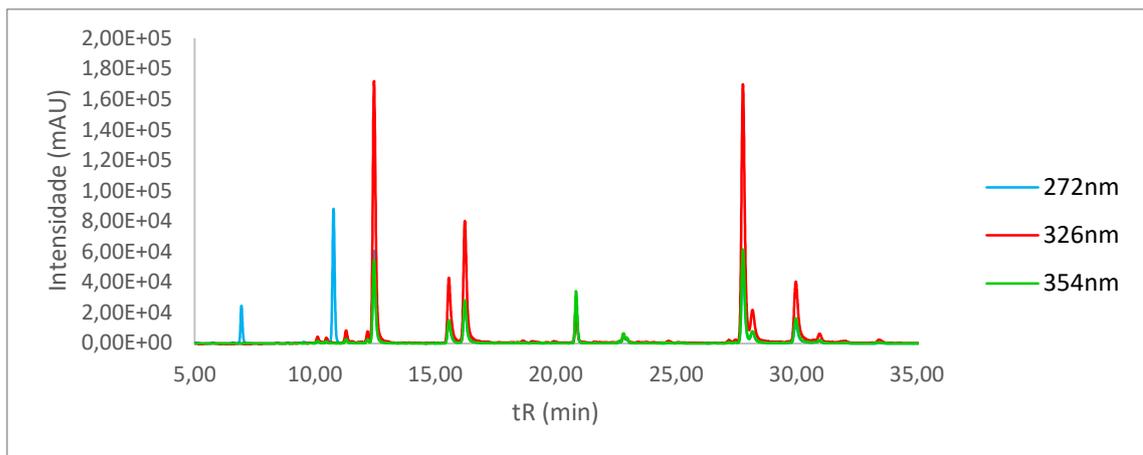
Fonte: A autora, 2021.

Figura 10. Cromatograma da amostra de erva mate para matchá, evidenciado a separação dos picos em 354nm. 4- Rutina



Fonte: A autora, 2021.

Figura 11. Cromatograma evidenciando os picos de separação dos compostos nos 3 comprimentos de onda em estudo (272, 326 e 354nm) da amostra de erva-mate para matchá.



Fonte: A autora, 2021.

Através da equação da reta de cada padrão, foi possível determinar a concentração do composto na amostra em unidades de mg L^{-1} . Utilizando o valor da massa exata de cada amostra, que foi realizada em balança analítica e considerando a diluição e o volume de solvente da extração foi possível determinar a concentração dos compostos em mg g^{-1} de erva-mate para matchá. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração dos compostos da erva-mate para matchá (mg g^{-1}) e figuras de mérito avaliadas.

	Amostra 1 * (mg g^{-1})	Amostra 2* (mg g^{-1})	Amostra 3* (mg g^{-1})	Média (mg g^{-1})	Desvio padrão	CV (%)
Teobromina	2,03	1,99	2,05	2,01	0,03	1,48
Cafeína	26,9	26,5	27,2	26,9	0,36	1,36
ACG	61,3	55,3	60,3	59,0	3,22	5,45
Rutina	54,4	55,8	55,9	55,3	0,85	1,53

*Análise em triplicata da amostra de erva-mate para matchá.

Fonte: A autora, 2021.

A título de comparação, foram extraídos e quantificados os mesmos componentes em estudo, de duas amostras de erva-mate processada industrialmente para chimarrão: a erva-mate Barão Premium e a Tradicional. Segundo o fabricante, as duas ervas passam pelo mesmo processo de beneficiamento, diferindo unicamente na composição. A erva-mate Premium, segundo a ervateira é elaborada com folhas selecionadas.

Para a comparação, todos os materiais, reagentes, equipamentos e métodos de extração e análise foram os mesmos que os utilizados para a amostra da erva-mate para matchá, conforme descrito no item 4.3.2 desse trabalho. As curvas de calibração usadas para quantificação também foram as mesmas. Os resultados da média da concentração dos componentes em mg g^{-1} estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparativo da média da concentração dos compostos da erva-mate para matchá com a erva-mate para chimarrão Premium e a erva-mate para chimarrão Tradicional.

Composto	Média da concentração (mg g ⁻¹)		
	Erva-mate para matchá	Erva-mate para chimarrão Premium	Erva-mate para chimarrão Tradicional
Teobromina	2,01 ± 0,03	1,08 ± 0,47	0,79 ± 0,34
Cafeína	26,9 ± 0,36	16,05 ± 0,99	11,6 ± 1,25
ACG	59,0 ± 3,22	21,8 ± 0,76	22,1 ± 2,50
Rutina	55,3 ± 0,85	7,18 ± 0,18	6,59 ± 0,47

Fonte: A autora, 2021.

Os valores encontrados para os compostos estão de acordo com os disponíveis na literatura, embora as concentrações variem de acordo com as características das amostras, método de extração e técnica de quantificação adotadas em cada trabalho.

Kaltbach, 2020 quantificou as metilxantinas como a teobromina e polifenóis como a rutina em bebidas à base de erva-mate e encontrou valores entre 1,13 a 2,28mg g⁻¹ para teobromina e de até 6,59mg g⁻¹ de rutina.⁷

No trabalho de Malmann, os valores de cafeína em diferentes amostras de erva-mate variam de 6,12 a 28,99mg g⁻¹.⁸

Butiuk, 2016 encontrou teores de ACG em folhas e caules de erva-mate variam de 31,6 a 80,8 mg g⁻¹.¹⁵

Todos os compostos encontrados na erva-mate para matchá também foram encontrados na erva-mate processada para chimarrão.

Foram observados valores mais altos, para todos os compostos presentes na erva-mate para matchá, quando comparadas ao produto processado industrialmente para chimarrão.

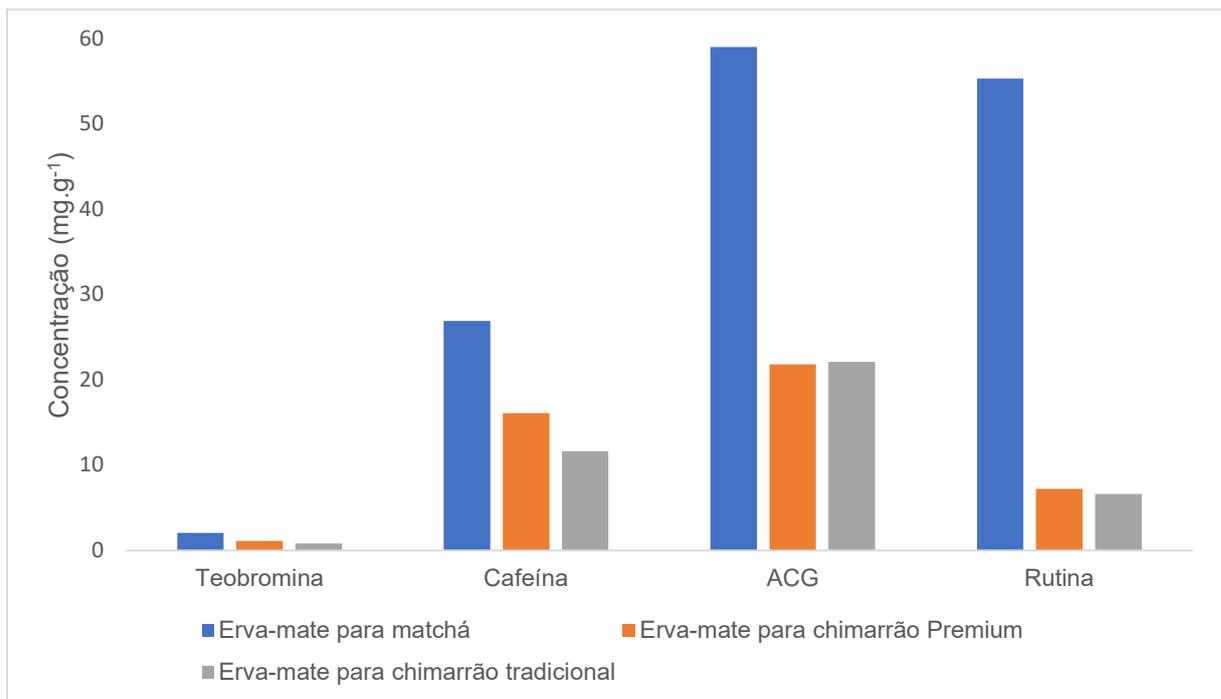
O ACG foi o composto encontrado em maior quantidade na erva-mate para matchá, sendo seu valor aproximadamente 2,7 vezes maior do que a erva-mate para chimarrão tradicional.

A rutina foi o composto que mais obteve diferença na concentração na comparação da erva-mate para matchá com a erva-mate para chimarrão, chegando à ordem de aproximadamente 8,4 vezes maior no produto processado para matchá.

Essa diferença de concentração pode ser atribuída ao processamento e características físicas dos produtos finais. Por ser de granulometria mais fina, a área da superfície da erva-mate para matchá é maior, facilitando assim a extração dos compostos bioativos. Outros fatores também podem estar ligados, ao clima, condições geográficas e modo de cultivo da planta. Também a proporção entre caule e folhas presentes na composição do produto pode variar, influenciando assim a concentração dos compostos.

Na Figura 12 é possível visualizar nos dados de concentração dos compostos na forma de gráfico.

Figura 12. Gráfico comparativo da concentração dos compostos teobromina, cafeína, ACG e rutina na erva-mate para matchá, erva-mate para chimarrão Premium e erva-mate para chimarrão tradicional.



Fonte: A autora, 2021.

Para avaliar se existem diferenças significativas entre a concentração dos compostos nos três diferentes produtos foram realizados dois testes estatísticos: o teste de análise de variância (ANOVA) e em seguida, com base nos resultados do primeiro, o teste de Tuckey.

A ANOVA, é uma análise realizada entre duas ou mais populações que permite avaliar o efeito dos fatores sobre a média da variável resposta e comparar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a média da variável resposta.³⁵

O teste foi realizado utilizando o software Microsoft Excel, com significância 5% ($\alpha=0,05$).

O resultado do teste de ANOVA encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados estatísticos do teste ANOVA

ANOVA				
Fonte de variação	Graus de liberdade	QM (quadrado médio)	F	F crítico
Amostra	2	2486,195	2651,25	3,40
Coluna	3	1692,026	1804,36	3,01
Interações	6	473,6745	505,12	2,51
Dentro (resíduo)	24	0,937744		

Fonte: A autora, 2021.

Quando a análise de variância é realizada em um experimento com apenas dois tratamentos, podemos visualizar apenas pelos valores de F e F-crítico se existem diferenças entre os tratamentos (se $F > F\text{-crítico}$ existem diferenças significativas entre os tratamentos). Contudo, quando há mais de dois tratamentos é necessário aplicar um teste de comparação de médias dos tratamentos, para concluir se há diferenças significativas entre eles.

O teste de Tuckey, pode ser utilizado para comparar todo e qualquer contraste entre duas ou mais médias de tratamentos. O teste é exato e de uso muito simples quando o número de repetições é o mesmo para todos os tratamentos.³⁶

Para o teste de Tuckey, foi calculada a diferença mínima significativa (dms), conforme a Equação 3, utilizando para tanto os dados do resultado da ANOVA e dados tabelados.

$$dms = q \sqrt{\frac{qmr}{r}} \quad [3]$$

Onde, q é o valor tabelado por Tuckey em função do número de tratamentos e dos graus de liberdade do resíduo, q_{mr} é o quadrado médio do resíduo da análise de variância e r é o número de repetições de cada um dos tratamentos.

De acordo com o teste, o resultado das médias é estatisticamente diferente toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior que o valor da dms .³⁶

A concentração dos compostos na erva-mate para matchá foi comparada estatisticamente com as concentrações erva-mate Premium e Tradicional, ambas destinadas para o preparo do chimarrão. Também foi realizado o comparativo estatístico entre as duas ervas-mates para chimarrão. Os resultados do teste estatístico de Tuckey, estão na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do teste estatístico de Tuckey

Dms calculada = 1,97				
	Teobromina	Cafeína	ACG	Rutina
Matchá – Premium	0,94 ^a	10,8 ^b	37,2 ^b	48,2 ^b
Matchá -Tradicional	1,23 ^a	15,3 ^b	36,9 ^b	48,8 ^b
Premium - Tradicional	0,29 ^a	4,45 ^b	0,30 ^a	0,59 ^a

^a sem diferença significativa ^b com diferença significativa

Fonte: A autora, 2021.

Com base nos resultados podemos observar que apenas a concentração de teobromina na erva-mate para matchá não obteve diferença significativa quando comparada às duas ervas para chimarrão. As concentrações de ACG e rutina tiveram diferença significativas na comparação erva-mate para matchá com ervas-mates para chimarrão. E as concentrações de cafeína tiveram diferenças significativas em todos os grupos avaliados.

6 CUSTOS DO PROJETO

Os custos do desenvolvimento de um método analítico, extração e quantificação de compostos bioativos de uma matriz sólida, como realizado nesse trabalho, são bastante complexos e envolvem diversos parâmetros, como: o

investimento inicial e a amortização do valor do equipamento (cromatógrafo), equipamento de ultrassom (utilizado nas extrações), balança, micropipetadores, purificador de água, computadores, manutenções, despesas com profissional ou equipe de especialistas técnicos que trabalham na pesquisa e testagem do método, além dos gastos com reagentes (padrões, solventes), consumíveis (colunas cromatográfica e membranas), vidrarias, consumo energético, entre outros.

Para estimativa dos custos do projeto, os custos com os equipamentos e manutenção não serão realizados, bem como o de vidrarias e da coluna, pois esses são de uso comum do laboratório CA102 da UFRGS. O custo com os profissionais, também não foi considerado, pois esse trabalho foi realizado apenas com estudantes e professores. Para esse trabalho, será realizada uma avaliação dos custos de material e reagentes que foram utilizados exclusivamente para esse estudo.

Primeiramente foi realizado um levantamento de valores de materiais, solventes e padrões necessários para a realização de todo o trabalho, incluindo curvas de calibração, extração e quantificação dos compostos. A cotação foi realizada em outubro de 2021 no site da empresa Pró-Análise de Porto Alegre, RS e no site da empresa Sigma-Aldrich.

Os valores foram calculados proporcionalmente, considerando 10% a mais para os solventes, atribuídas a perdas no processo, estabilização do equipamento, testes e outros. A proporção levou em conta a quantidade utilizada de cada material, visto que o montante remanescente (da embalagem comprada) dos produtos e reagentes podem ser utilizados para outras atividades do laboratório CA102 da UFRGS e não foram comprados com destino exclusivo para esse trabalho.

Os dados da estimativa de custos estão a apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico

Parte I – Reagentes				
Reagente	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo Proporcional (R\$)
Acetonitrila grau HPLC	2,5L	935,00	0,5L	205,70
Etanol grau HPLC	1,0L	738,65	0,1L	81,21
Ácido fórmico (98%)	1,0L	266,79	0,05	2,93
Parte II. Consumíveis				
Consumível	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo Proporcional (R\$)
Unidade filtrante em acetato celulose 25mm 0,22µm, corpo em pvc, hidrofílico, não estéril. (Millipore)	Caixa com 250 unidades	3231,77	9	116,34
Membrana filtrante acetato celulose 47mm 0,22 µm (Millipore)	Caixa com 100 unidades	421,96	2	8,45

Parte III. Padrões

Padrão Sigma-Aldrich	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo Proporcional (R\$)
Cafeína	1kg	407,00	100mg	0,04
Teobromina	25g	383,00	50mg	0,77
5-CGA	1g	1.074,00	50mg	53,70
Rutina	50mg	1.475,00	25mg	737,50

Parte IV – Custos com energia elétrica

Equipamentos	Consumo (kWh)	Preço por hora (R\$)*	Tempo utilizado (h)	Custo (R\$)
HPLC-DAD	4,3	9,49	50	474,50

*Tarifa bandeira vermelha agosto 2021

Fonte: A autora, 2021.

A estimativa do custo total do projeto foi de R\$1681,14. Levando-se em conta que foram analisadas 3 amostras, todas elas em triplicata, o valor do custo por análise, para quantificação dos compostos teobromina, cafeína, ACG e rutina em erva-mate foi de R\$156,39. Contudo, sabe-se que esse valor é consideravelmente maior em função dos custos mencionados que não foram contabilizados nesse trabalho.

7 CONCLUSÃO

A quantificação dos compostos bioativos teobromina, cafeína, ACG e rutina na erva-mate para matchá por HPLC apresentou resultados superiores em todos os aspectos avaliados e significativamente diferentes, na comparação com a erva-mate para chimarrão exceto para a teobromina, através da análise estatística pelo método ANOVA e Tuckey.

O método HPLC, utilizando padrões analíticos para calibração externa, mostrou ser adequado para a análise quantitativa, dentro dos critérios de validação avaliados.

A diferença entre os resultados obtidos na concentração dos compostos na erva-mate para matchá em comparação com a erva-mate tradicional para chimarrão,

foi atribuída principalmente ao tipo de processamento, que é exclusivo da produção desse produto. Contudo, como sugestão para trabalhos futuros, uma avaliação de outros critérios podem ser avaliadas como o clima, condições geográficas, modo de cultivo da planta, proporção entre caule e folhas do produto, envelhecimento da folha, entre outros.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ RIETVELD, Anton; WISEMAN, Sheila. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3285S-3292S, 2003.
- ² AZEVEDO, R. S. A et al. Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 39-44, 2019.
- ³ OELLIG, Claudia; SCHUNCK, Jacob; SCHWACK, Wolfgang. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1533, p. 208-212, 2018.
- ⁴ OLIVEIRA, Sibeles Vasconcelos de; WAQUIL, Paulo Dabdab. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 45, p. 750-756, 2014.
- ⁵ IBGE, **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso: set/21.
- ⁶ HECK, Caleb I.; DE MEJIA, E. Gonzalez. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.
- ⁷ KALTBACH, Pedro et al. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, p. 103568, 2020.
- ⁸ MALLMANN, M. D. **Influência do tipo de plantio e etapas do processo de industrialização sobre os compostos fenólicos e metilxantinas da erva-mate**. 2018, 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- ⁹ INOVAMANTE. POP- Procedimento operacional padrão. **Ficha técnica do matchá de erva mate Matequero**. Revisão 00, pág 1 a 4.
- ¹⁰ MARTINEZ, Sabrina Teixeira et al. Determinação por HPLC de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 954-956, 2007.
- ¹¹ GUIMARÃES, Lucas Costa; SILVA, Danielle Faria. Utilização da cafeína como ergogênico nutricional no exercício físico. **Conexão Ciência (Online)**, v. 8, n. 1, p. 59-74, 2013.
- ¹² National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 5429, **Theobromine, Caffeine, Rutine**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theobromine>. Acesso em: 05 out. 2021.

- ¹³ BAGGOTT, Matthew J. et al. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 228, n. 1, p. 109-118, 2013.
- ¹⁴ SOUISSI, Youssef; SOUISSI, Makram; CHTOUROU, Hamdi. Effects of caffeine ingestion on the diurnal variation of cognitive and repeated high-intensity performances. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 177, p. 69-74, 2019.
- ¹⁵ BUTIUK, Ana P. et al. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 27-33, 2016.
- ¹⁶ DA SILVEIRA, Tayse Ferreira Ferreira et al. Optimization of the preparation conditions of yerba mate tea beverage to maximize chlorogenic acids extraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 219-223, 2017.
- ¹⁷ ANESINI, Claudia et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- ¹⁸ PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.
- ¹⁹ AHMAD, Rizwan et al. Solvent and temperature effect of accelerated solvent extraction (ASE) coupled with ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC-PDA) for the determination of methyl xanthines in commercial tea and coffee. **Food Chemistry**, v. 311, p. 126021, 2020.
- ²⁰ NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- ²¹ COTTA, Jussara Aparecida Oliveira; REZENDE, Maria Olímpia Oliveira; LANDGRAF, Maria Diva. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2026-2033, 2009.
- ²² BIESAGA, Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 18, p. 2505-2512, 2011.
- ²³ HEGEL, P. et al. Alkaloid-rich vs. antioxidant-rich yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts: Exploiting the selectivity of supercritical CO₂ using hydrated ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 172, p. 105200, 2021.
- ²⁴ BENDICHO, C. et al. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-60, 2012.

- ²⁵ CAPOTE, F. Priego; DE CASTRO, MD Luque. **Analytical Applications of Ultrasound**. Elsevier, 2007.
- ²⁶ PERALTA-JIMÉNEZ, L.; CAÑIZARES-MACÍAS, M. P. Ultrasound-assisted method for extraction of theobromine and caffeine from cacao seeds and chocolate products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3522-3529, 2013.
- ²⁷ Kazakevich, Y.V.; Lobrutto, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. John Wiley & Sons. 3ªEd, 2017.
- ²⁸ Nollet, L.M.; Toldrá, F. **Food Analysis by HPLC**. CRC press. V.6, 2012.
- ²⁹ DONG, Michael W. **Modern HPLC for Practicing Scientists**. John Wiley & Sons, 2006.
- ³⁰ ROSA, Guilherme et al. Fenólicos e Atividade Antioxidante de Pimentas Doces Verdes e Vermelhas da Agricultura Orgânica e Convencional: Um Estudo Comparativo. **Agricultura**, v.10, p 652. 2020.
- ³¹ GIUSTI, Federica et al. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, v. 221, p. 689-697, 2017.
- ³² Agilent technologies. **LC e LC/MS Seu recurso essencial para colunas e consumíveis**. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5991-1059PTBR.pdf>. Acesso out/21.
- ³³ RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina S. Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Vol.27, pág 771-780, 2004.
- ³⁴ SANTOS, Anai Loreiro dos. **Recuperação de compostos bioativos do resíduo do processamento do café (silverskin): otimização do processo de extração; caracterização química, capacidade antioxidante e toxicidade dos extratos**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- ³⁵ ALENCAR, Airlane P. Análise de Variância e outras análises. Disponível em: <https://www.ime.usp.br/~lane/home/MAE0261/ANOVA2018.pdf>. Acesso: Out. 2021.
- ³⁶ OLIVEIRA, Andréia Fróes Galuci. Testes estatísticos para comparação de médias. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 6, p. 777-788, 2008.