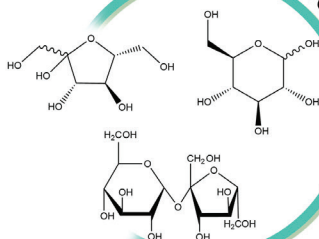
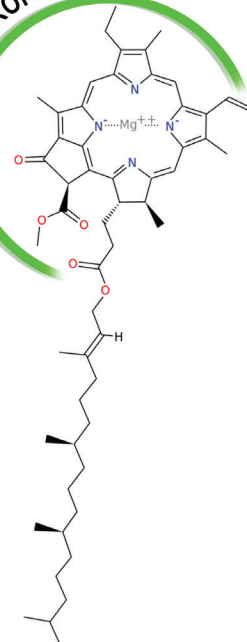


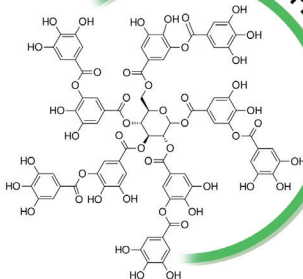
AÇÚCARES



CLOROFILA



POLIFENÓIS

COMUNICADO
TÉCNICO

476

Colombo, PR
Dezembro, 2021

Método de fracionamento de extratos de erva-mate e separação dos compostos fenólicos dos açúcares

Washington Luiz Esteves Magalhães
Mailson Matos
Aline Krolow Soares
Fabrício Augusto Hansel
Ivar Wendling

Método de fracionamento de extratos de erva-mate e separação dos compostos fenólicos dos açúcares

Washington Luiz Esteves Magalhães, Engenheiro Químico, doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Mailson Matos**, Engenheiro Químico, estudante de doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **Aline Krolow Soares**, Engenheira Industrial Madeireira, estudante de doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **Fabricio Augusto Hansel**, Químico, doutor em Química, analista da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Ivar Wendling**, Engenheiro Florestal, doutor em Ciências Florestais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma espécie nativa da América do Sul e tradicionalmente consumida como bebida em chás e chimarrão. Desde os primeiros relatos de seu consumo por indígenas da etnia Guarani até os modelos de consumo atuais, a erva-mate tem tido papel central na evolução socioeconômica e cultural dos povos que habitam a América do Sul. Em países como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, seu consumo se tornou expressão cultural (Gan et al., 2018).

Ao longo das décadas, cientistas começaram a desvendar os segredos que levaram a erva-mate a se tornar uma espécie tão atrativa. Suas folhas contêm compostos antioxidantes (Berté et al., 2011), anti-inflamatórios (Gomez-Juaristi et al., 2018) e são eficazes contra o dano oxidativo ao DNA (Mejia et al., 2005), possuindo potencial para eliminar os radicais livres (Riachi et al., 2018). O consumo de erva-mate também é um método eficaz e econômico de prevenção contra doenças cardiovasculares (Gebara et al., 2017).

Essas propriedades requeridas em diversos alimentos funcionais e fármacos são atribuídas aos compostos bioativos presentes nas folhas dessa espécie. As principais classes químicas bioativas presentes são metilxantinas (por exemplo, teobromina, cafeína) e compostos fenólicos, tais como flavonoides (por exemplo, kampeferol e rutina) e ácidos cafeoilquínico (por exemplo, 3-cafeoilquínico [3-CQA], 4-cafeoilquínico [4-CQA], 5-cafeoilquínico [5-CQA] ácidos, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico [3,5-DQA], ácidos 4,5-dicafeoilquínico) (Meinhart et al., 2017).

Visto que há um mercado consolidado de plantio e uso da erva-mate, é possível pensar num modelo alternativo de processamento das folhas para obtenção dos compostos individualizados, baseado nos conceitos da biorrefinaria e economia circular. Assim, este comunicado visa apresentar um método eficiente para a separação de extratos hidrofílicos e lipofílicos e de compostos fenólicos e açúcares advindos do extrato hidrofílico (Figura 1).

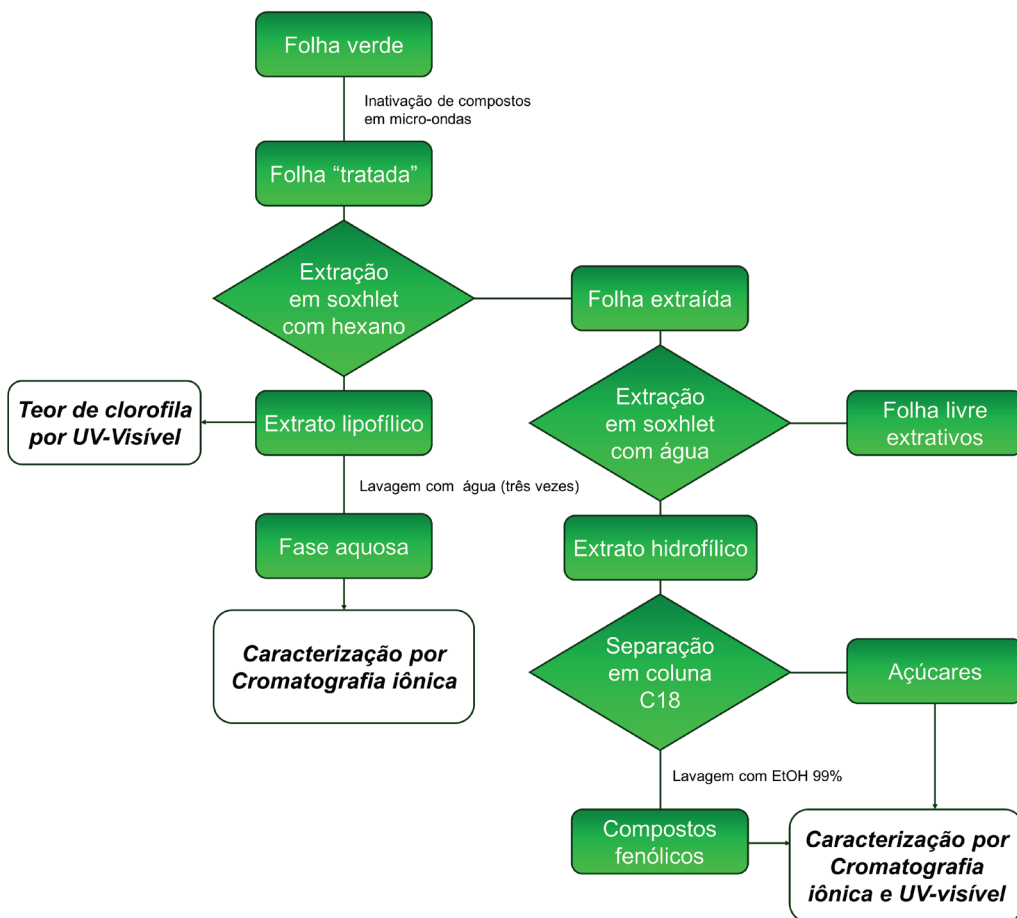


Figura 1. Diagrama esquemático da metodologia.

Extração por solvente em extrator tipo Soxhlet

As folhas de erva-mate foram colhidas em plantios experimentais da Embrapa Florestas, situados em Colombo, PR. Essas folhas foram secas

em micro-ondas por 6 minutos, com intervalos de 1 minuto, até total desidratação, para evitar a rápida oxidação e, a partir delas, foram realizadas extrações em equipamento Soxhlet (Figura 2), utilizando-se primeiramente o solvente orgânico hexano.

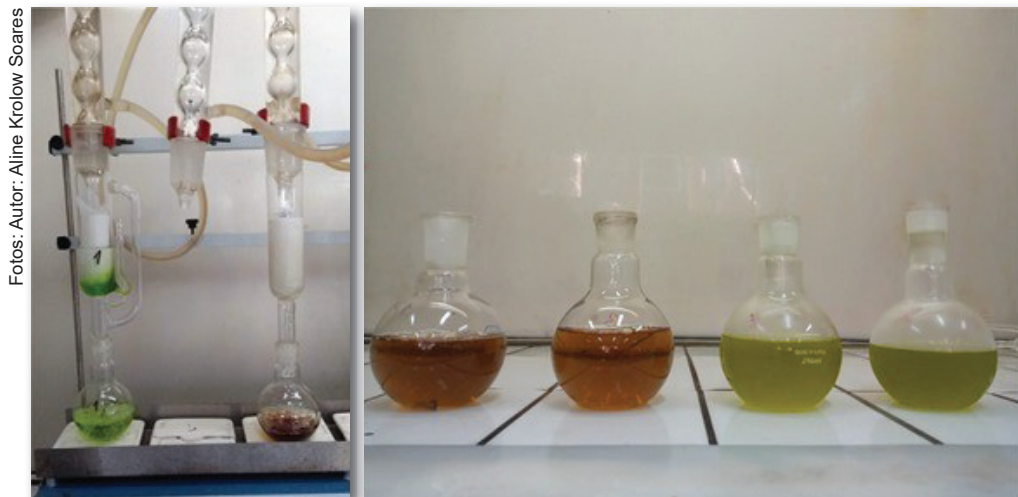


Figura 2. Extração soxhlet com hexano e água, respectivamente.

Nessa análise, foram adicionados 4 g de amostra em um cartucho de celulose e 200 mL de hexano no balão tipo referedor. O conjunto (balão + extrator + condensador) foi conectado e colocado em chapa de aquecimento. A extração foi realizada por 6 horas ou até a clarificação do solvente. Após a extração, as folhas foram secas sob temperatura de 100 °C e o teor de extrativos lipofílicos foi determinado por gravimetria (Equação 1).

A partir das folhas secas e livres de extrativos solúveis em hexano, foi realizada uma nova extração em soxhlet utilizando água como solvente até extração total dos componentes hidrofílicos. O extrato final em cada uma das extrações foi armazenado para análises posteriores. O teor de extrativos em água foi calculado (Equação 2) após a secagem das folhas livres de extrativos em estufa sob temperatura de 100 °C.

$$\text{Extrativos em hexano (\%)} = \frac{m_{\text{antes da extração}} - m_{\text{após a extração}}}{m_{\text{antes da extração}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Extrativos em água (\%)} = \frac{m_{\text{antes da extração}} - m_{\text{ext lipofílico}} - m_{\text{livres de extrativos}}}{m_{\text{antes da extração}}} \times 100 \quad (2)$$

Fracionamento e caracterização do extrato lipofílico

O extrato lipofílico foi lavado com água deionizada, por três vezes, para a retirada de possíveis compostos que têm maior afinidade com a água, tais como açúcares. Para isso, foi tomada uma alíquota de 3 mL do extrato lipofílico e adicionou-se 2 mL de água deionizada em um tubo de ensaio, o qual foi misturado em vórtex por 30 segundos e, em seguida, centrifugado a 3.000 rpm durante 60 segundos. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

A quantificação do teor de clorofila na fração lipofílica foi realizada por espectroscopia no UV-visível. A clorofila a foi determinada de acordo com o método proposto por Zhang et al. (2009), no qual uma alíquota de 4 mL do extrato lipofílico foi medida em um espectrofotômetro da Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240). A absorbância do extrato lipofílico foi medida nos comprimentos de onda de 663 nm e 645 nm, utilizando-se como “branco” o solvente orgânico hexano. A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em mg de clorofila por litro de extrato (Equação 3).

A fase aquosa foi analisada por meio de cromatografia iônica, utilizando uma curva de calibração construída de 0,5 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹ para glucose (R²: 0,9997), 0,5 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹ para

sacarose (R²: 0,9998) e de 1,5 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹ para frutose (R²: 0,9962). Para as medidas foi utilizada uma coluna Carbo Pac PA 20 (4 mm x 250 mm e temperatura de 30 °C), com NaOH 300 mM como eluente, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Fracionamento e caracterização do extrato aquoso

O extrato hidrofílico foi fracionado utilizando-se uma coluna C18 (Figura 3). Nesse processo, as colunas C18 foram ambientadas primeiramente com 3 mL de acetato de etila, seguido por 3 mL de etanol e, por fim, com 3 mL de água, ficando em repouso por 5 minutos para secagem. Após este período, foi adicionado 1,5 mL do extrato hidrofílico da erva-mate, previamente acidificado para pH 1, utilizando-se o ácido fosfórico 85%. Também 3 mL de água foram adicionados na coluna C18 após a passagem do extrato, cuja parte aquosa contendo açúcares foi coletada em frasco para análises posteriores. Os compostos fenólicos que foram adsorvidos pela coluna C18 foram dessorvidos utilizando 3 mL de etanol 99%, para a obtenção dos compostos fenólicos, que possuem maior afinidade com o álcool do que com a água.

$$\text{Teor de clorofila (mg/L)} = 20,31 (\text{abs } 645 \text{ nm}) + 8,05 (\text{abs } 663 \text{ nm})$$

(3)



Foto: Autor: Aline Krolow Soares

Figura 3. Método de separação dos açúcares e polifenóis.

O extrato hidrofílico e os produtos da separação da coluna C18 (fração aquosa e a fração etanólica) foram analisados quanto ao teor de açúcares, utilizando-se cromatografia iônica, mediante uma curva de calibração construída de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ a 10 mg L^{-1} para glucose (R^2 : 0,9997), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ a 10 mg L^{-1} para sacarose (R^2 : 0,9998) e de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ a 10 mg L^{-1} para frutose (R^2 : 0,9962). Para as medidas foi utilizada uma coluna Carbo Pac PA 20 (4 mm x 250 mm e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$), com NaOH 300 mM como eluente, numa vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton e Rossi (1965). Para isso, foi realizada uma reação entre o extrato analisado com o reagente Folin-Ciocalteu e o carbonato de sódio (Na_2CO_3 15%), numa proporção 1:4 entre os reagentes. Após duas horas

de reação, a absorbância foi medida a 760 nm , utilizando um espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) e cubetas de quartzo, tendo como “branco” todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenólicos totais foi determinado por meio de interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico ($10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a $350 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Validação do método

A extração com solventes produziu dois extratos: um lipofílico e um aquoso. No lipofílico, o solvente utilizado foi o hexano, cuja fração foram extraídos cerca de 11% da matéria contida nas folhas (Tabela 1). O rendimento obtido

Tabela 1. Rendimento de extrativos das folhas de erva-mate em hexano e água, teor de clorofila no extrato lipofílico

Parâmetro	Conteúdo
Teor de extrativos em hexano (%)	11 ± 1
Teor de extrativos em água (%)	44 ± 1
Concentração de clorofila no extrato lipofílico (mg/L)	4 ± 1

foi semelhante ao reportado por Valduga et al. (2016), aproximadamente 10% em base seca. O método de extração por soxhlet foi mais eficiente que outros métodos de extração de compostos apolares da erva-mate, com o uso de hexano. Por exemplo, folhas maceradas e extraída com o solvente sob agitação produziu rendimento de 2,4%, e quando usado ultrassom o rendimento foi 2,9% (Jacques et al., 2006). Isso se deve ao fato da extração em soxhlet ser sempre realizada pelo solvente limpo, ou seja, livre de extrativos, pois o solvente é constantemente destilado e, em seguida, condensado na parte central do soxhlet. Esse processo evita a saturação do solvente tal como aquela ocorrendo nos métodos de extração citados.

O extrato obtido apresentava a cor verde, provavelmente devido à presença de clorofila, na concentração de 4 mg L⁻¹.

O extrato lipofílico foi lavado com água e a fração aquosa obtida foi analisada por cromatografia iônica, para a quantificação dos açúcares. Contudo, não foram identificadas quantidades relevantes de açúcares.

O outro extrato foi obtido em água, sendo extraído 44% da massa das folhas. Rendimento semelhante ao do presente trabalho foi encontrado por Aliabadi et al. (2020) (42% em base seca). Esse extrato, então, foi analisado por cromatografia iônica, para quantificar os açúcares presentes. A sacarose foi encontrada em maior quantidade (54 mg L⁻¹), glicose e frutose em quantidades menores (Tabela 2). Na separação dos açúcares dos compostos fenólicos por meio da separação por coluna, toda a frutose presente foi recuperada. Contudo, o mesmo não ocorreu com a glicose e com a sacarose, tendo sido

Tabela 2. Concentração de açúcares presentes no extrato aquoso e quantidade recuperada na separação por coluna.

Açúcar	Extrato aquoso (mg L ⁻¹)	Fração aquosa	
		(mg L ⁻¹)	Recuperado (%)
Glicose	3,1	1,8	57
Sacarose	54,0	24,0	45
Frutose	8,3	8,6	100

recuperados 57% da glicose e 45% da sacarose. Provavelmente, esse baixo valor de recuperação se deveu à maior interação desses açúcares com a coluna. Portanto, para obter maior eficiência no processo de separação, é necessário um maior número de eluições com o solvente utilizado (água).

Quanto aos compostos fenólicos medidos pelo método de Folin-Ciocalteu, foram encontrados valores da ordem de 4 mg L⁻¹ equivalentes ao do ácido gálico (Tabela 3). Além disso, ocorreu a recuperação de praticamente todo o material presente na solução inicial, sendo que a maioria (mais de 92%) ficou concentrada na fração etanólica, mostrando assim a eficiência na separação dos compostos fenólicos dos açúcares presentes no extrato aquoso.

Considerações finais

O método apresentado se mostrou eficiente para a extração dos compostos lipofílicos e hidrofílicos presentes nas folhas de erva-mate.

Referências

- ALIABADI, M.; CHEE, B. S.; MATOS, M.; CORTESE, Y. J.; NUGENT, M. J. D.; LIMA, T. A. M.; MAGALHAES, W. L. E.; LIMA, G. G. Yerba mate extract in microfibrillated cellulose and corn starch films as a potential wound healing bandage. **Polymers**, v. 12, n. 12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym12122807>.
- BERTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; RIBANI, R. H. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., *Aquifoliaceae*) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2008343>.
- GAN, R. Y.; ZHANG, D.; WANG, M.; CORKE, H. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1682, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10111682>.
- GEBARA, K. S.; GASPAROTTO-JUNIOR, A.; SANTIAGO, P. G.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, L. M. de; MORAND, C.; COSTA, T. A.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of mate (*Ilex Paraguariensis* A.St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 10093-10100, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04093>.
- GOMEZ-JUARISTI, M.; MARTINEZ-LOPEZ, S.; SARRIA, B.; BRAVO, L.; MATEOS, R. Absorption and metabolism of yerba mate

Tabela 3. Concentração de compostos fenólicos, expressos em equivalente ao ácido gálico, presentes no extrato aquoso e quantidade recuperada na separação por coluna.

Açúcar	Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperado (%)
Extrato aquoso	4,0 ± 0,2	-
Fração aquosa	0,2 ± 0,1	4,4 ± 3,6
Fração etanólica	3,7 ± 0,2	92 ± 4

phenolic compounds in humans. **Food Chemistry Elsevier**, v. 240, p. 1028-1038, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.003>.

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PERES, V. F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; CAMARÃO, E. B. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): a study of extraction methods. **Journal of Separation Science**. v. 29, n. 18, p. 2780-2784, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200600024>.

MEINHART, A. D.; DAMIN, F. M.; CALDEIRÃO, L.; SILVEIRA, T. F. F. da; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. **Food Research International**, v. 99, p. 522-530, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.017>.

MEJIA, E. G.; YOUNG, S. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf048158g>.

RIACHI, L. G.; SIMAS, D. L. R.; COELHO, G. C.; MARCELLINI, P. S.; RIBEIRO DA SILVA, A. J.; BASTOS DE MARIA, C. A. Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in mate extracted from yerba mate (*Ilex Paraguariensis* A. St.- Hil.). **Food Chemistry**, v. 266, p. 317-322, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.028>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; DARTORA, N.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SOUZA, L. M. de. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542016000100011>.

ZHANG, J.; HAN, C.; LIU, Z. Absorption spectrum estimating rice chlorophyll concentration: preliminary investigations. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 1, n. 5, p. 223-229, 2009.

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão digital (2021)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Elisabete Marques Oaida

Membros

Annete Bonnet

Cristiane Aparecida Fioravante Reis

Guilherme Schnell e Schühli

Krisle da Silva

Marcelo Francia Arco-Verde

Marcia Toffani Simão Soares

Marilice Cordeiro Garrastazu

Valderés Aparecida de Sousa

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

Foto capa:

Maisson Matos