

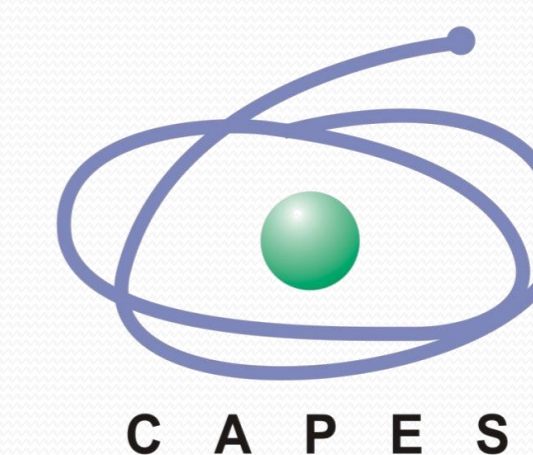
COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS AQUOSOS INGERIDOS DURANTE O CONSUMO DO CHIMARRÃO



UNICAMP

Juliana Kelen Godoy¹, Tayse Ferreira Ferreira da Silveira², Adriana Dillenburg Meinhart³, Helena Teixeira Godoy⁴
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (DCA) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)

Agradecimentos:



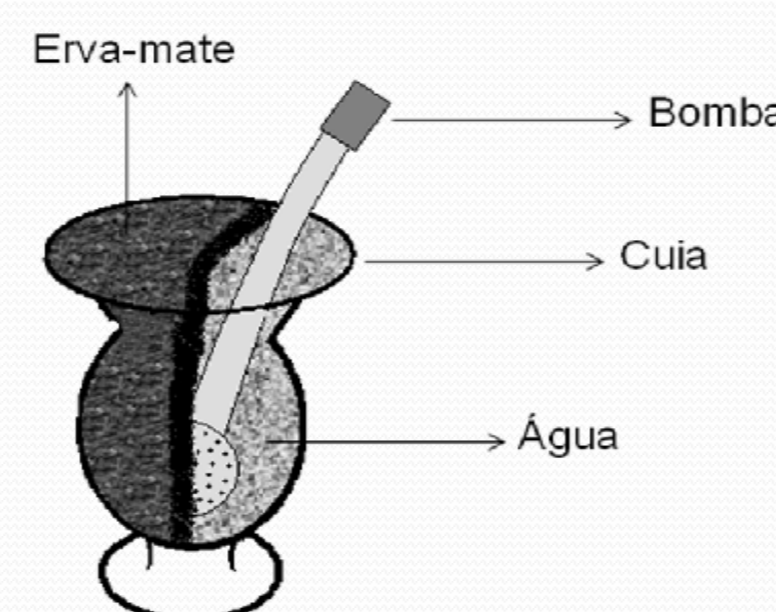
Palavras-chave: *Ilex paraguariensis* - fenólicos - flavonóides - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

INTRODUÇÃO

-A erva-mate *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire é uma planta nativa da América do Sul. As folhas e talos são utilizados para o preparado de chás (conhecidos como “chá mate”) ou bebidas com infusões parciais com água quente ou gelada, chamados, respectivamente de “chimarrão” e “tererê”.

- Preparo do chimarrão:

O chimarrão é preparado em um recipiente denominado “cuia” onde a erva-mate é disposta de forma vertical em 2/3 do recipiente e o restante do espaço é preenchido com água quente. Em seguida o consumidor ingere o líquido através de um objeto metálico (na forma de um canudo) conhecido como “bomba”.



-Elevados níveis de compostos fenólicos, cuja ação biológica está diretamente ligada a eliminação dos radicais livres protegendo os tecidos do corpo contra o estresse oxidativo, cujos danos implicam no envelhecimento celular e patogêneses de várias doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, inflamações e outros.

- Os ácidos fenólicos mais encontrados na erva-mate são o ácido clorogênico, ácido cafeico, 3,4 dicafeoilquinico, 3,5 dicafeoilquinico, 4,5 dicafeoilquinico, ácido ferrúlico, ácido p-cumárico, ácido gálico, siríngico e os flavonóides kaempferol, quercetina e rutina.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para determinação de compostos fenólicos (ácido gálico, ácido 5-cafeoilquinico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, ácido 3,4-dicafeoilquinico, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-dicafeoilquinico e rutina) em extratos aquosos de chimarrão, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

METODOLOGIA

Obtenção do extrato aquoso

A extração foi conduzida da seguinte forma: para o preparo do chimarrão foram pesados 85 g de erva-mate em uma cuia de tamanho médio, seguindo o modo de preparo indicado no rótulo do produto. A erva-mate foi acondicionada verticalmente como ocupando 2/3 da cuia. Em seguida, foi adicionada água quente à 75°C até completar o volume vazio. Após 30 segundos, o líquido que o consumir normalmente ingere foi extraído com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplado à bomba do chimarrão. Após um intervalo de 2 minutos, a cuia foi novamente completada com água quente e o segundo extrato foi novamente succionado com bomba a vácuo e assim sucessivamente simulando o consumo normal.

Avaliação do método

O método foi avaliado seguindo as recomendações do Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis [1]. Os parâmetros de validação foram limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão intra-dia e entre dias.

Os limites de detecção foram estimados através da diluição sucessiva do padrão adicionado em solução padrão. O limite de quantificação foi considerado como sendo seis vezes o limite de detecção.

A faixa de linearidade do método foi verificada para cada um dos compostos fenólicos analisados. Foram construídas curvas de calibração aleatórias e em triplicata verdadeira, as concentrações correspondentes ao limite de quantificação variaram entre 0,015 e 0,0625; no nível intermediário entre 4,0 e 20,0 e no nível máximo da curva foram entre 7,0 e 35,0. As curvas foram avaliadas quanto ao ajuste dos modelos a fim de validar sua aplicação na quantificação das amostras.

Para a avaliação da precisão intra-dia foram realizadas 10 determinações, em um mesmo dia, contemplando o intervalo linear do método, em três níveis de concentrações, incluindo o limite de quantificação (LOQ), o ponto intermediário da faixa linear e ponto máximo da mesma. Para a avaliação da precisão entre dias foram realizadas 3 determinações em três níveis (o LOQ, o ponto intermediário da faixa linear e ponto máximo), cada qual em 5 replicatas.

RESULTADOS

Condições Cromatográficas

A partir de diversos ensaios realizados, avaliando foi possível concluir que a melhor combinação entre o tipo de coluna e a fase móvel foi: coluna C18, com comprimento de 100 mm, tamanho de partícula de 3 µm e diâmetro interno de 4,6 mm; com fase móvel foi composta por solvente A (água:Ácido fórmico (0,1%), B (metanol), cuja eluição em gradiente linear teve como programação 86,1: 13,9 (A:B) até 60:40 (A:B), em 39,4 minutos; Posteriormente a coluna foi reequilibrada para as condições iniciais por 10 minutos. O volume de injeção foi de 30 µL, a vazão de fase móvel foi mantida em 0,8 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna em 30° C. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 325 nm.

Validação do método

Os resultados para a validação foram adequados segundo a ANVISA [2], já que os valores de coeficiente de variação para precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaios não devem exceder 15% de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20% do CV). Na Tabela 1 podem ser visualizados os resultados observados quanto à linearidade, os limites de detecção e os limites de quantificação.

Tabela 1. Limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ), linearidade e ajuste da curva para cada composto fenólico analisado

COMPOSTO	LOD (mg.L ⁻¹)	LOQ (mg.L ⁻¹)	LINEARIDADE (mg.L ⁻¹)	R ²
ÁCIDO GÁLICO	0,003	0,015	0,1-7	0,9992
ÁCIDO CLOROGÊNICO	0,0125	0,0625	0,3- 21	0,9991
ÁCIDO CAFEICO	0,0125	0,0625	0,1-7	0,9991
ÁCIDO SIRÍNGICO	0,025	0,125	0,1-7	0,9994
ÁCIDO p-Cumárico	0,025	0,125	0,1-7	0,9985
Ácido Ferrúlico	0,006	0,03	0,1-7	0,9991
3,4-DQA*	0,006	0,03	0,2-14	0,9983
3,5-DQA**	0,0125	0,0625	0,5-35	0,9979
4,5-DQA***	0,006	0,03	0,2-14	0,9983
RUTINA	0,0125	0,0625	0,1-8	0,9984

*3,4 dicafeoilquinico; **3,5 dicafeoilquinico; ***4,5 dicafeoilquinico

Na Figura 1 pode ser visualizado um cromatograma dos padrões dos 10 compostos fenólicos nas condições finais de separação do método. A Figura 2 mostra um cromatograma do extrato aquoso de chimarrão preparado a partir da erva-mate tradicional.

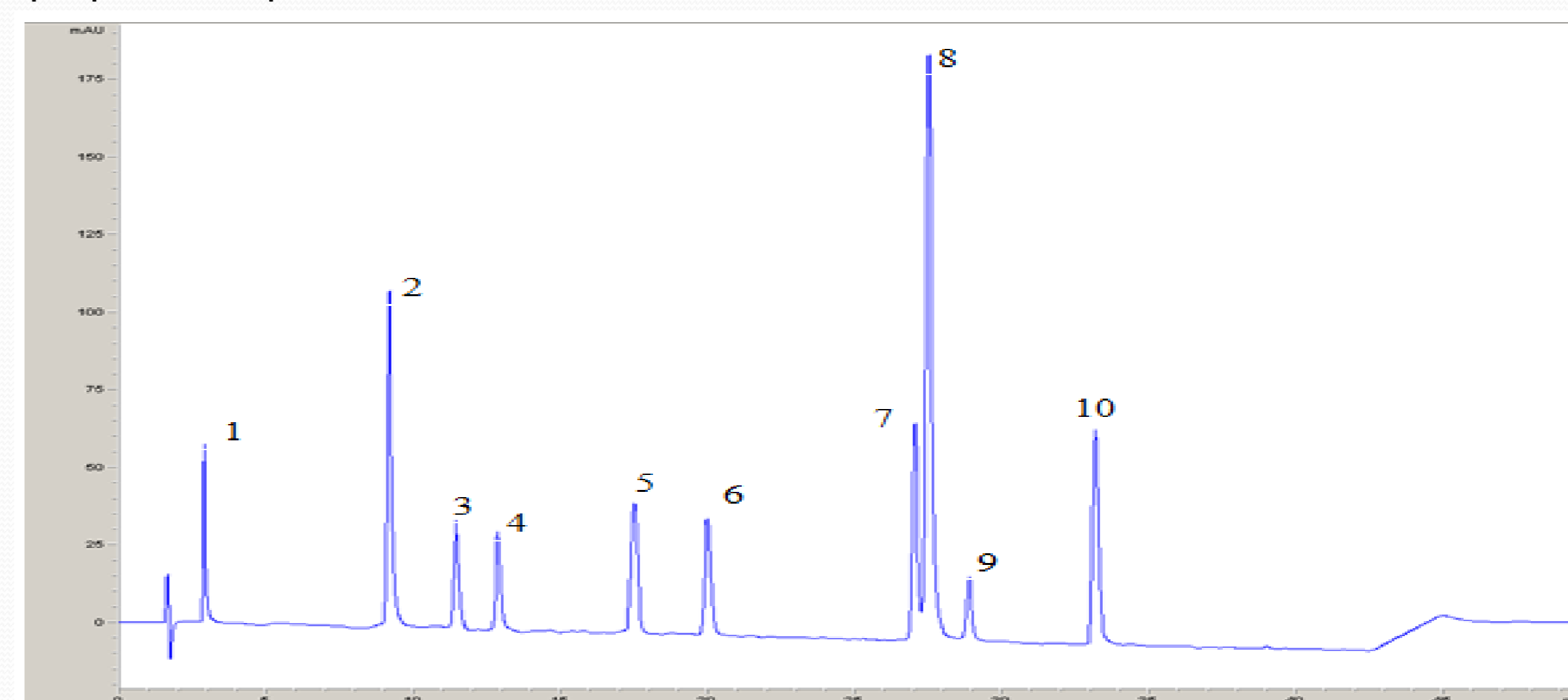


Figura 1. Cromatograma do pool de fenólicos obtido pela condição otimizada em laboratório, descrita no item 3.1. Os compostos destacados a 280 nm são: 1) Ácido Gálico, 2)Ácido Clorogênico, 3) Ácido Cafeico, 4) Ácido Siríngico, 5) p-CoQA, 6) ácido Ferrúlico, 7) 3,4-di-DQA, 8) 3,5-di-DQA, 9) Rutina, 10) 4,5-di-DQA.

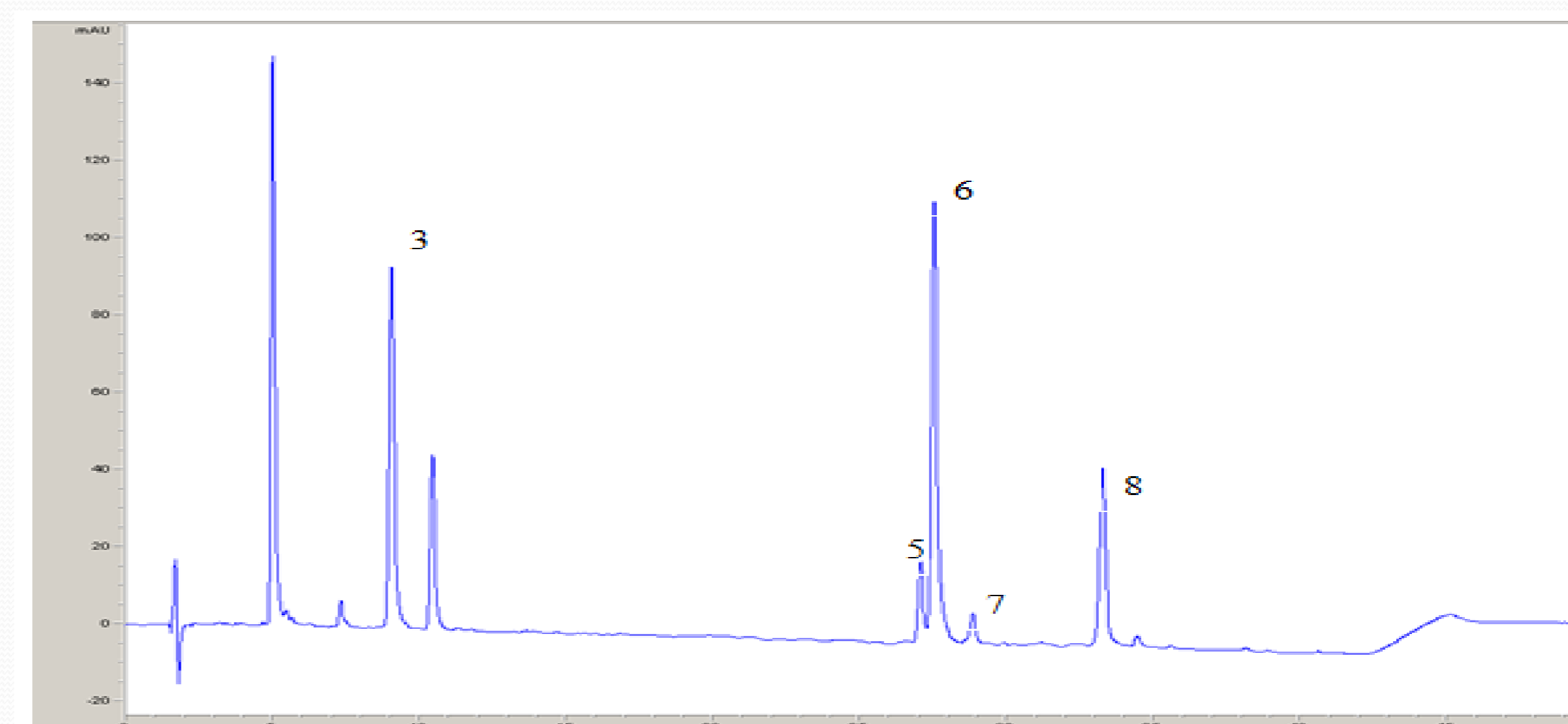


Figura 2. Cromatograma do extrato aquoso de chimarrão a partir de erva-mate tradicional. Os compostos destacados a 325 nm são: 3) Ácido Clorogênico, 5) 3,4-di-DQA, 6) 3,5-di-DQA, 7) Rutina, 8) 4,5-di-DQA.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE, utilizando eluição em gradiente, permitiu a separação de 10 compostos fenólicos. O método mostrou-se linear na faixa de concentração estudada para os compostos, apresentou seletividade, precisão intra- dias e inter dias com valores de coeficiente de variação de acordo com as exigências de validação da ANVISA. Quando aplicado em amostra, o método mostrou-se adequado para determinação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos de chimarrão.

REFERÊNCIAS

- [1] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003.
[2] Thompson, M., Ellison, S. R. L., Wood, R. (2002) Harmonized Guidelines For Singlelaboratory Validation Of Methods Of Analysis. Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

1Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos - godoy.fea@gmail.com.
2Bolsista FAPESP: Mestrado em Engenharia de Alimentos - ferreira.tayse@gmail.com
3Co-Orientador: Pesquisador - adrianadille@gmail.com
4Orientador: Pesquisador - helena@fea.unicamp.br