

ANÁLISE DE METILXANTINAS EM DEZESSEIS PROGÊNIES DE ERVA MATE EXTRAÍDAS POR DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

CARDOZO JUNIOR, E. L.*¹; CARDOZO-FILHO, L.²; STURION, J. A.³; DONADUZZI, C. M.¹; URIO, H.²; ZANOELO, E. F.⁴

RESUMO

A *Ilex paraguariensis* apresenta grande potencial de utilização pela diversidade de seus compostos químicos. Dentre os principais grupos de compostos presentes em erva mate citam-se as metilxantinas, com predominância de cafeína, teobromina e traços de teofilina. Na quantificação convencional destes compostos utiliza-se extração com solvente orgânico que expressa o conteúdo total de cafeína presente na amostra. Como forma alternativa de obtenção das metilxantinas pode-se utilizar a extração por fluido supercrítico (EFSC). Esta extração caracteriza-se pela obtenção de produtos de elevada qualidade, sem as inconveniências de resíduos de solventes e alterações nas propriedades do extrato presente na extração convencional. O objetivo deste trabalho foi quantificar metilxantinas presentes nas amostras de dezesseis progênies oriundas de quatro procedências (Ivaí/PR, Barão de Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/PR e Cascavel/PR), cultivadas em três localidades (Ivaí/PR, Rio Azul/PR e Guarapuava/PR) utilizando a extração por solventes orgânicos e pela EFSC usando como solvente o CO₂. As metilxantinas foram quantificadas por HPLC e espectrometria comparando-se com padrão. Os teores médios de metilxantinas, correspondendo à soma de cafeína e teobromina, foram de 19,112 mg/100 g nas progênies de Ivaí/PR, 8,906 mg/100 g nas progênies de Rio Azul/PR e de 12,796 mg/100 g nas progênies de Guarapuava/PR. Ao compararmos a extração supercrítica com a extração convencional de cafeína os valores médios encontrados foram de 2,808±0,7 % para Ivaí/PR, 1,537±0,2 % em Rio Azul/PR e 1,728±0,5 % para Guarapuava/PR. A EFSC usando o dióxido de carbono como solvente aliada à análise HPLC mostrou-se eficiente na caracterização e quantificação das metilxantinas presentes nas amostras analisadas.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, metilxantinas, extração supercrítica.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis presents great use potential for the diversity of their chemical compositions. Among the main groups of present compositions in maté herb are mentioned the methylxanthines, with caffeine predominance, theobromine and theophylline lines. In the conventional quantification of these compositions extraction is used with organic solvents and that expressed the total content of present caffeine in the sample. As alternative form of obtaining of the methylxanthines can be used the extraction by supercritical flowed extraction (EFSC). This extraction is characterized by the obtaining of high quality products, without the

¹ UNIPAR – Universidade Paranaense - Av. Parigot de Souza, 3636 – Jardim Prada – Toledo/PR – Brasil - CEP: 85.903-170 - *euclideslc@unipar.br

² UEM – Universidade Estadual de Maringá – Depto de Engenharia Química – Av. Colombo, 5790 - Maringá/PR - Brasil - CEP:87.020-900 –. cardozo@uem.br

³ EMBRAPA Florestas - Estrada da Ribeira Km 111 - Colombo/PR – Brasil CEP: 83.411-000 - sturion@cnpf.embrapa.br

⁴ URI-Campus de Erechim – Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – Depto de Engenharia de Alimentos – Av. Sete de Setembro, 1621 - CEP:99700-000 – Erechim /RS

inconveniences of solvents residues and of alteration in the properties of the presents extract in the conventional extraction. The objective of this work was to analyze the content of methylxanthines in the samples of sixteen progenies originating from four origins (Ivaí/PR, Barão de Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/Pr and Cascavel/PR), and cultivated at three locals (Ivaí/PR, Rio Azul/PR and Guarapuava/PR) using the extraction for organic solvents and by EFSC using as solvent CO₂. The methylxanthines contained in the extracts of the samples of herb leaves dries obtained by both extraction processes were quantified by HPLC and spectrometric methods being compared with pattern. The medium tenors of extracted methylxanthines, corresponding to the caffeine sum and teobromina, it was of 19,112 mg/100 g in the progenies of Ivaí/PR, 8,906 mg/100 g in the progenies of Rio Azul/PR and of 12,796 mg/100 g in the progenies of Guarapuava/PR. Comparing the supercritical extraction with the conventional extraction of caffeine the medium values were of 2,808±0,7% to Ivaí/PR, 1,537±0,2% in Rio Azul/PR and 1,728±0,5% for Guarapuava/PR. The EFSC using the carbon dioxide as solvent allied the analysis HPLC was shown efficient in the characterization and quantification of the presence methylxanthines in the analyzed samples.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, methylxanthines, supercritical extraction.

INTRODUÇÃO

A erva mate é uma espécie sul-americana usada tradicionalmente como bebida estimulante pela população do cone sul da América do Sul. Esta espécie apresenta grande potencial de utilização pela diversidade de seus compostos químicos. Dentre os principais grupos de compostos citam-se metilxantinas, fenóis derivados do ácido clorogênico, saponinas triterpênicas entre outros (ALIKARIDIS, 1987). Além do uso tradicional que se faz da erva mate destaca-se sua atividade biológica como antioxidante (GUGLIUCCI, 1996) e termogênica (MARTINET *et alli*, 1999) demonstrando o potencial de utilização da planta como matéria prima para outros produtos.

Algumas das atividades biológicas da erva mate estão ligadas à presença das metilxantinas à semelhança de outras espécies estimulantes como o café, guaraná, noz de cola, cacau e chá. A cafeína é a principal metilxantina encontrada em erva mate, seguida da teobromina e em quantidades menores a teofilina. Estes compostos variam na sua concentração dependendo do material genético utilizado, das variáveis ambientais, das técnicas de cultivo e processamento e dos métodos extrativos utilizados para sua quantificação. Atualmente ganha-se importância pesquisas relacionando as variáveis acima citadas com o teor de compostos químicos buscando materiais e tecnologias direcionadas para utilizações específicas desta espécie. Também aumenta o interesse da pesquisa correlacionando teor de compostos químicos com material genético conhecido, buscando estratégias de melhoramento a partir da composição química da planta. A obtenção dos compostos químicos contidos no extrato da erva mate geralmente ocorre via extração por solventes orgânicos. Tratando-se de pequenas amostras a extração por solventes orgânicos possui alguns inconvenientes como, por exemplo, a alta temperatura envolvida no processo de extração que pode alterar as características dos compostos presentes na planta “*in natura*” (ESMELINDRO *et alli*, 2002). Neste sentido, a extração com fluido supercrítico (EFSC) mostra-se uma alternativa promissora para a obtenção de compostos químicos a partir do extrato da erva mate.

A EFSC é uma tecnologia que vem sendo empregada, nas duas últimas décadas, para a obtenção de óleos essenciais, fragrâncias, aromas e extratos. Essa tecnologia caracteriza-se como um procedimento de obtenção de produtos de elevada qualidade, sem as

inconveniências de resíduos de solventes e de alteração nas propriedades do extrato apresentadas nos processos de extração convencionais (CARDOZO-FILHO *et alli*, 1999; SALDAÑA *et alli*, 2000). Buscou-se neste trabalho a quantificação de metilxantinas (cafeína e teobromina) em dezesseis progênies de erva mate cultivadas em três localidades do estado do Paraná extraídas por CO₂ supercrítico comparando-se com valores de cafeína obtidos por extração convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas do cultivo monitorado de plantas de erva mate selecionadas entre dezesseis progênies com maior produção de massa foliar de um teste de progênies instalado com material genético comum nos municípios de Ivaí/PR (março de 1997), Rio Azul/PR (julho de 1997) e Guarapuava/PR (agosto de 1997). Os materiais avaliados eram compostos de quatro progênies das procedências de Ivaí/PR, Barão de Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/PR e Cascavel/PR, sendo quatro progênies de cada procedência. A identificação das progênies esta sistematizada na Tabela 01.

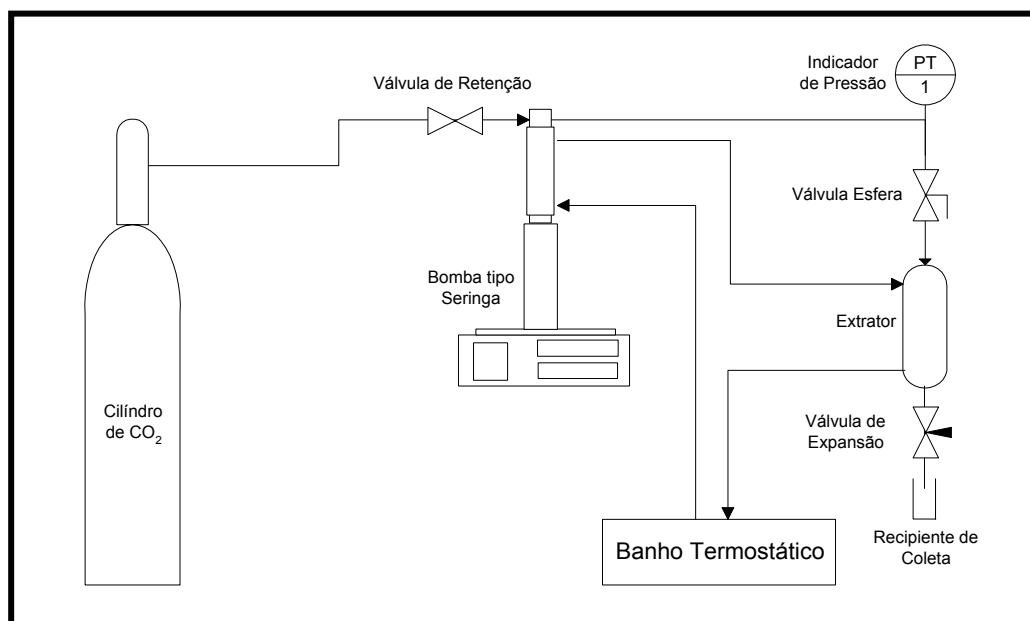
Tabela 01: Identificação das dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) analisadas segundo sua procedência.

PROCEDÊNCIAS	Ivaí/PR	Barão de Cotegipe/RS	Quedas do Iguaçu/PR	Cascavel/PR
	P-01	P-51	P-80	P-151
PROGÊNIES	P-03	P-59	P-81	P-155
	P-05	P-61	P-88	P-165
	P-10	P-65	P-100	P-171

O delineamento experimental empregado nos três locais foi o de blocos ao acaso, com seis plantas por parcela linear. Foram coletados amostras de três blocos constituídas das folhas e ramos com diâmetro inferior a 3 mm composta das seis árvores, o material foi homogeneizado e retirou-se amostra de 3 kg para processamento. As amostras foram submetidas individualmente a um banho em água fervente por 10 segundos. Retiraram-se manualmente as folhas dos galhos selecionando-se folhas com ausência de manchas e sujidades. As folhas verdes foram levadas à estufa com circulação de ar para secagem a 45 °C. Depois de secas as folhas foram moídas manualmente e peneiradas. As partículas que ficaram retidas na peneira Tyler tamanho 42 foram as selecionadas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em embalagens de papel, envolvidas por plástico e armazenadas em ambiente refrigerado. Estas amostras foram utilizadas na obtenção do extrato da erva mate utilizando a extração convencional via solvente orgânico e com dióxido de carbono supercrítico.

O experimento de extração supercrítica das metilxantinas foi realizado utilizando o equipamento mostrado esquematicamente na Figura 01, o qual consiste, basicamente, de um cilindro de CO₂, uma bomba de alta pressão, um vaso extrator, um transdutor de pressão e um banho termostático. Nesta etapa, o extrator foi preenchido com 20 g de amostra de erva-mate, previamente selecionada em peneira Tyler tamanho 42. Nas condições utilizadas de 20 °C e pressão de 150 bar, o CO₂ possui altas taxas de transferência de massa devido à baixa viscosidade, e elevados valores de difusividade, o que dá grande poder de penetração na matriz sólida. Nessas condições, o fluido permaneceu em contato com a amostra de erva-mate por uma hora para posterior extração mantendo a vazão média de 1 mL/min durante uma hora.

Figura 01: Diagrama esquemático do aparato experimental para extração por dióxido de carbono supercrítico.



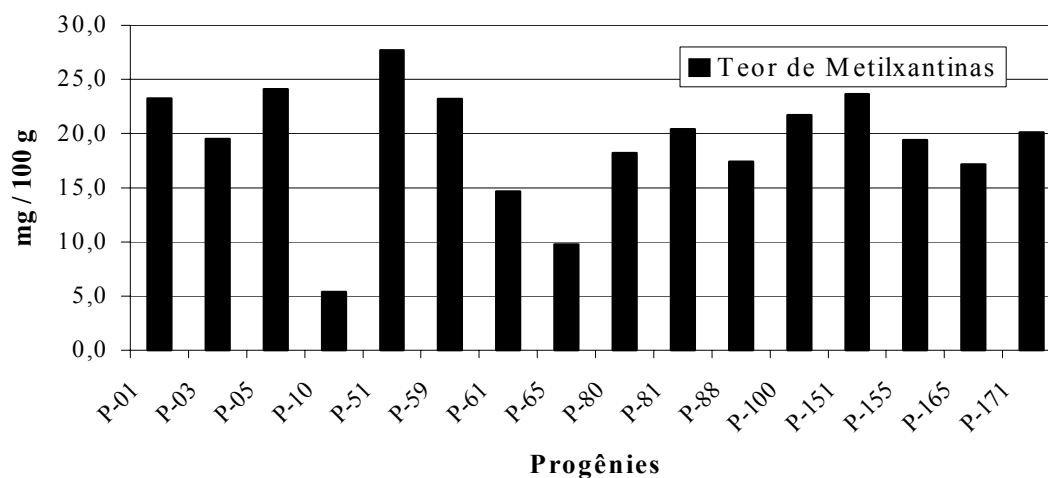
A quantificação de metilxantinas a partir do extrato supercrítico foi realizada em aparelho HPLC - High Performance Liquid Chromatography – Mod CG 480-C, com detector UV-Vis Mod Jasco UV-970-975 a 280 nm e coluna C₁₈ (Supelco, 250 mm x 4,6 μm), o solvente isocrático utilizado foi solução de 40% de metanol em água acidificada com 0,5% de ácido acético. O fluxo empregado foi de 1,0 ml/min. Utilizou-se cafeína e teobromina Synth como padrão. Para análise de cafeína total nas amostras extraiu-se a cafeína segundo sua solubilidade em clorofórmio (Vetec), após tratamento da amostra com ácido sulfúrico (Vetec). A quantificação foi realizada por espectrofotometria a 275 nm em espectrofotômetro FEMTO 700, utilizando-se padrão de cafeína (Synth) como referência e metodologia clássica desenvolvida por INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g do composto / 100 g de matéria seca. Para a análise estatística utilizou-se o teste F com 1% e 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais utilizadas o teor médio de metilxantinas extraídas, correspondendo à soma de massa de cafeína mais massa de teobromina, foi de 19,112 mg/100 g nas progênes de Ivaí/PR, 8,906 mg/100 g nas progênes de Rio Azul/PR e de 12,796 mg/100 g nas progênes de Guarapuava/PR. Ao compararmos a extração supercrítica com a extração convencional de cafeína os valores médios encontrados para as dezesseis progênes foram de $2,808 \pm 0,7\%$ para as progênes de Ivaí/PR, $1,537 \pm 0,2\%$ nas progênes de Rio Azul/PR e $1,728 \pm 0,5\%$ para as progênes de Guarapuava/PR. Os valores obtidos para cada progênie estão demonstrados nas Figuras 02 a 04.

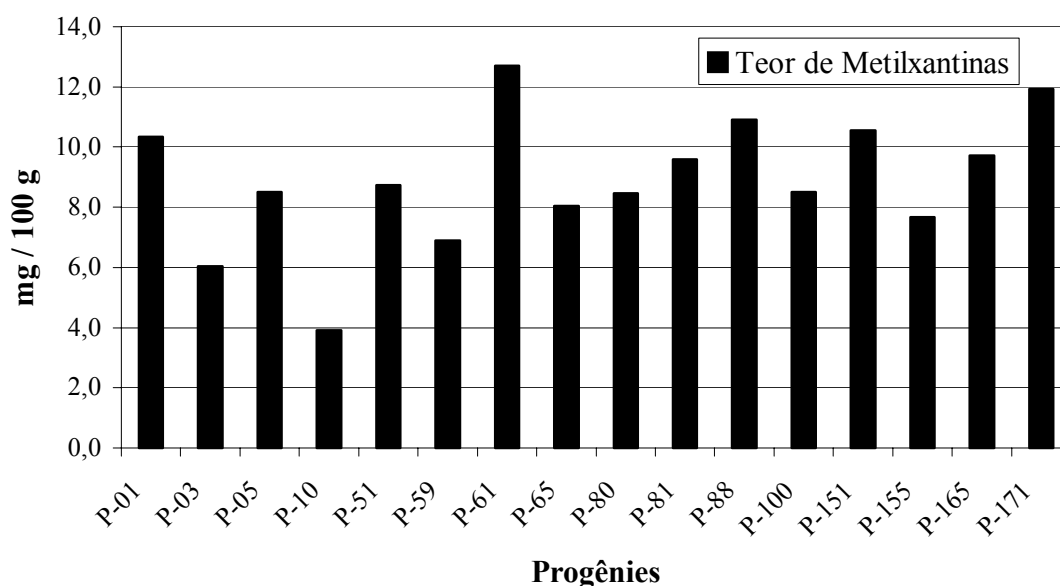
As progênes cultivadas em Ivaí/PR tiveram valores máximos de 27,69 mg de metilxantinas extraídas na progênie P-51 e valores de mínimo para a progênie P-10 de 5,41 mg como pode ser observado na Figura 02. A mesma progênie teve valor de mínimo de cafeína quando analisadas por técnica convencional (Tabela 02).

Figura 02: Teor de metilxantinas (caféina + teobromina) em dezesseis progênes de erva mate (*Ilex paraguariensis*) cultivadas em Ivaí/PR, extraídas por dióxido de carbono supercrítico. Valores expressos em mg / 100 g de erva mate.



As progênes cultivadas em Rio Azul/PR tiveram valores máximos de 12,71 mg de metilxantinas extraídas na progênes P-61 e valores de mínimo para a progênes P-10 de 3,91 mg como pode ser observado na Figura 03. As mesmas progênes tiveram valores de máximo e mínimo quando analisadas por técnica convencional (Tabela 02).

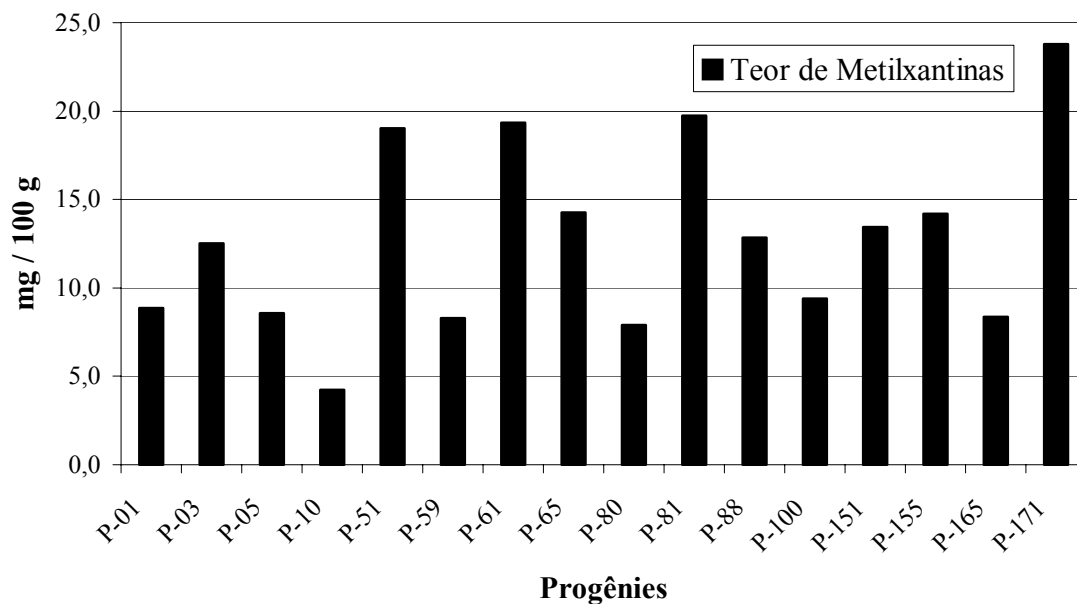
Figura 03: Teor de metilxantinas (caféina + teobromina) em dezesseis progênes de erva mate (*Ilex paraguariensis*) cultivadas em Rio Azul/PR, extraídas por CO₂ supercrítico. Valores expressos em mg / 100 g de erva mate.



As progênes cultivadas em Guarapuava/PR tiveram valores máximos de 23,80 mg de metilxantinas extraídas na progênes P-171 e valores de mínimo para a progênes P-10 de 4,22

mg como pode ser observado na Figura 04. A mesma progênie teve valor de mínimo quando analisada por técnica convencional (Tabela 02).

Figura 04: Teor de metilxantinas (caféina + teobromina) em dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis*) cultivadas em Guarapuava/PR, extraídas por CO₂ supercrítico. Valores expressos em mg / 100 g de erva mate.



O teor de caféina por extração convencional, bem como por extração em dióxido de carbono supercrítico diferiu significativamente quando se comparam as progênies de maior e menor produção dos compostos, como pode ser observado na Tabela 02. A progênie P-10 apresentou comportamento semelhante nas três localidades de cultivo.

Tabela 02: Análise do teor de metilxantinas (%) em dezesseis progênes de erva-mate, cultivadas em três regiões do estado do Paraná.

Localidade	Variáveis	Progênes		C.V.(%)
		Maior	Menor	
Ivaí / PR	<i>Cafeína Total</i>	0,963 (59)**	0,343 (10)	22,6
	Cafeína ¹	0,02751 (51)*	0,00499 (10)	34,4
	Teobromina	0,00042 (10)**	0,00003 (65)	63,3
	Metilxantinas	0,02769 (51)*	0,00541 (10)	34,4
Rio Azul / PR	<i>Cafeína Total</i>	0,770 (61)*	0,380 (10)	22,4
	Cafeína ¹	0,01263 (61)*	0,00363 (10)	27,3
	Teobromina	0,00029 (10)**	0,00001 (1)	56,9
	Metilxantinas	0,01271 (61)*	0,00392 (10)	27,0
Guarapuava / PR	<i>Cafeína Total</i>	1,047 (1)**	0,223 (10)	26,2
	Cafeína ¹	0,02372 (171)**	0,00405 (10)	43,5
	Teobromina	0,00017 (10)**	0,00002 (10e 59)	67,2
	Metilxantinas	0,02380 (171)**	0,00422 (10)	43,5

** e * significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F; Cafeína total obtida por extração convencional; Cafeína¹ extração por dióxido de carbono supercrítico.

CONCLUSÕES

O teor de cafeína é bem superior ao teor de teobromina para todas as amostras analisadas. Este resultado condiz com dados apresentados na literatura (SALDAÑA *et alli*, 2000 e ESMELINDRO *et alli*, 2002).

A EFSC usando o dióxido de carbono como solvente mostrou-se ser uma alternativa eficiente à extração de metilxantinas comparando-se com extração por solventes convencionais.

Houve diferença significativa no teor de metilxantinas entre as progênes em ambos os processos extrativos, sugerindo que, caso se queira relacionar algum efeito (Ex: propriedades organolépticas, atividade biológica) com os teores de metilxantinas obtidos a partir das progênes de erva mate analisadas o teor de cafeína total pode não ser um parâmetro adequado.

Nota-se, ainda, que a progênie de número P-10 apresentou menores teores de metilxantinas nas três localidades de cultivo. Indicando que, produtos com baixos teores de metilxantinas podem ser obtidos utilizando essa progênie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Eng. Agrônomo Dalnei Neiverth e Sr. Afonso Oliszeski da Neiverth & Cia. Ltda. (Chimarrão Bitumirim) de Ivaí/PR; Sr. Antônio Fagundes Schier da Erva-Mate Schier Indústria e Comércio Ltda. de Guarapuava/PR; Eng. Agrônomo Ângelo

Luíz Ulbrich da ALU - Agronomia e Planejamento Agrário Ltda. de Rio Azul/PR pela cessão de área física, colaboração na instalação, condução e avaliação dos testes. A Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIKARIDIS, F. **Natural constituents of Ilex species.** *Journal of Ethnopharmacology*. 20: 121-144, 1987.
- ESMELINDRO, M. C., TONIAZZO, DARIVA, C., de OLIVEIRA, D., LOPES, D. **The Effects of Manufacturing Steps on the Chemical Characteristics of the Extracts from SCFE of Mate Tea Leaves.** *Chemical Engineering Transactions*, vol. 2, p. 241-246, 2002.
- CARDOZO-FILHO, L., WOLFF, F., DARIVA, C. **Extração de Componentes Erva-mate usando o Dióxido de Carbono Supercrítico.** I CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, Maringá, 1999.
- CLIFFORD, M.N. **Chlorogenic Acids and Purine Alkaloids Contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) Leaf and Beverage.** *Food Chemistry*, vol. 35, p. 13-21, 1990.
- GUGLIUCCI, A. **Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo.** *Biochem. Biophi. Res. Commun.* 224(2): 338-44 1996.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.** Vol 1, São Paulo: O Instituto, 1985. p. 190-192
- MARTINET, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. **Termogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity.** *Phytomedicine* 6(4) 231-8, 1999.
- SALDAÑA, M.D.A., MOHAMED, R.S. & MAZZAFERA, P., **Supercritical Carbon Dioxide Extration of Methylxanthines from Maté Tea Leaves.** *Brazilian Journal of Chemistry. Eng.*, 17(3): 1-14, 2000.