COMPOSIÇÃO FENÓLICA DE EXTRATO AQUOSO COMPOSTO POR ERVA-MATE VERDE (*ILEX PARAGUARIENSIS*), CAPIM-LIMÃO (*CYMBOPOGON CITRATUS*) E ERVA-CIDREIRA (*MELISSA OFFICINALIS*) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-ESI-MS/MS): OTIMIZAÇÃO POR DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS.

Ana Letícia Kincheski Coelho[1] (PROVIC/UEPG), Jânio Sousa Santos[1] (Co-orientador), Heitor Daguer[2], Anderson de Souza Sant'Ana[3], Daniel Granato[1] (Orientador), e-mail: granatod@gmail.com
[1] Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos.
[2] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Santa Catarina.
[3] Universidade Estadual de Campinas.

Área do CNPq: Ciências Agrárias.
Sub-área do CNPq: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Palavras-chave: atividade antioxidante; estudo *in vitro*; correlação estatística.

Resumo
A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), a erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) são plantas utilizadas para o preparo de chás que apresentam benefícios à saúde. De tal modo, os objetivos do presente estudo foram otimizar um extrato aquoso obtido a partir das três plantas com base na atividade antioxidante *in vitro* e compostos fenólicos totais, analisar seu potencial antimicrobiano e seu perfil fenólico usando técnicas espectrofotométricas e cromatográficas. Os resultados foram submetidos à metodologia de superfície de resposta e a função de desejabilidade foi empregada para maximizar a extração de compostos antioxidantes das matrizes herbáceas. A otimização simultânea indicou que o extrato contendo 70% de erva-mate e 30% de erva-cidreira foi a melhor solução matemática. O extrato otimizado não apresentou atividade antimicrobiana frente a micro-organismos Gram +, Gram -, e levedura. O perfil fenólico do extrato otimizado mostrou ser composto, principalmente, por ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, rutina, ácido p-cumarico e quercetina.

Introdução

Os chás de ervas são conhecidos por conter uma variedade de fitoquímicos ativos com propriedades biológicas que promovem a saúde humana e ajudam a reduzir o risco de doenças crônicas. Além de apresentarem atividade antioxidante, estudos demonstram que os polifenóis extraídos de várias ervas inibem o crescimento de um largo espectro de bactérias (CRAIG, 1999).

De acordo com Granato et al. (2014), os estudos têm como objetivo principal avaliar os efeitos de diferentes solventes empregados na extração de compostos fenólicos. Assim sendo não é de conhecimento como a realização de uma mistura de diferentes tipos de chás poderiam afetar a funcionalidade e a composição química da mistura.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi otimizar uma mistura de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em relação à atividade antioxidante *in vitro* e teor de

compostos fenólicos totais onde foram analisados testes antimicrobianos e a caracterização do perfil de fenólicos no extrato otimizado.

Materiais e Métodos

Amostras: Folhas secas autênticas de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e erva-cidreira (*Melissa officinalis*), e o pó da erva-mate verde (*Ilex paraguariensis)* foram obtidas no comércio de Ponta Grossa-PR. Estas foram trituradas usando moinho de facas (Tec Mill TE-633, Tecnal), sendo passadas em peneiras para a padronização do tamanho de 60 Tyler/mesh.

Planejamento experimental: Um delineamento simplex-centroide com três componentes (*Ilex paraguariensis, Melissa officinalis* e *Cymbopogon citratus*) totalizando 7 (sete) diferentes formulações foi utilizado para testar diferentes misturas binárias e ternárias das ervas. As extrações foram realizadas com a adição de 3,0 g em 100 mL de água destilada a 80 ± 2 ºC, em um recipiente com temperatura controlada e agitação por um período de 10 minutos.

Determinação do teor de compostos fenólicos totais: O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em triplicata por meio do método de azul da Prússia descrito por Margraf et al. (2015) sendo os resultados obtidos expressos em mg de ácido gálico equivalente por litro (mg AGE/L).

Determinação da atividade antioxidante in vitro: A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada por meio de quatro diferentes ensaios: poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996), a ação antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH foi determinada pelo método proposto por Brand-Williams et al. (1995), a capacidade redutora total (CRT) foi medida pelo método modificado de Folin-Ciocalteu proposto por Berker et al. (2013) e a capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu foi medida pela metodologia proposta por Margraf et al. (2015). Para todas estas análises as absorbâncias foram lidas utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA).

Metodologia de superfície de resposta (MSR) e otimização estatística: A MSR foi utilizada para propor equações matemática que explicassem os efeitos de cada amostra empregada que estão relacionados com o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante dos extratos. A qualidade dos modelos e a adequação foram aferidas pelo coeficiente de regressão (R^2), seu R^2 ajustado e pela significância do modelo ($p \leq 0,20$). A mistura otimizada entre os extratos com o conteúdo fenólico e atividade antioxidante maximizada foi determinada por meio da aplicação da função de desejabilidade proposta por Derringer e Suich (1980), com um total de 100 iterações. Este extrato otimizado foi liofilizado para utilização nas análises referentes à atividade antimicrobiana e à quantificação dos compostos fenólicos. O software Statistica v.7 (Statsoft, EUA) foi usado para as análises de MSR e otimização.

Atividade antimicrobiana do extrato otimizado: A atividade antimicrobiana do composto liofilizado foi realizada conforme a metodologia proposta por Cleeland e Squires (1991) por difusão em cavidade de placa com concentração bacteriana de 10^6 UFC/mL frente aos microrganismos *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525*), Pseudomonas aeruginosas* (IAL 1853), *Bacillus cereus* (IAL 55), *Escherichia coli* (IAL 2064), *Salmonella* Enterica (S 2887), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006).

Perfil fenólico qualitativo do extrato otimizado: O perfil fenólico foi determinado de acordo com Seraglio et al. (2016), com adaptações, por meio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência 1290 Infinity acoplado à espectrometria de massas.

Análise estatística

Os resultados obtidos em todas as análises foram apresentados como média ± desvio padrão combinado. Para comparar as variáveis de resposta, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) unifatorial seguida do teste de Duncan. As correlações lineares entre as variáveis foram medidas e expressas pelo coeficiente de correlação de Pearson. O software Statistica v. 7.0 (Statsoft, EUA) foi utilizado.

Resultados e Discussão

Verifica-se que os maiores valores obtidos para o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante *in vitro* pertencem aos extratos contendo apenas a erva-mate e os menores valores obtidos ao extrato contendo somente o capim-limão, menos para a CRT em que a amostra contendo apenas erva-cidreira apresentou menor valor (Tabela 1). O extrato que apresentou maior atividade antioxidante *in vitro* foi o de erva-mate, seguido da erva-cidreira e do capim-limão. As variáveis apresentaram correlações significativas com todos os métodos utilizados. Os compostos fenólicos totais obtiveram correlação significativa ($p<0,01$) para a capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu ($r=0,92$), FRAP ($r=0,90$), DPPH• ($r=0,97$) e CRT ($r=0,92$).

Tabela 1 – Resultados para o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante *in vitro* individual e das combinações dos extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis)*, erva-cidreira (*Melissa officinalis)* e capim-limão (*Cymbopogon citratus)*.

Ilex paraguariensis	*Melissa officinalis*	*Cymbopogon citratus*	Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (mg AGE/L)	FRAP (mg AAE/L)	DPPH• (mg AAE/L)	Capacidade redutora total (mg QE/L)	Compostos fenólicos totais (mg AGE/L)
1,00	0,00	0,00	4342±289^{a}	22103±525^{a}	2809±88^{a}	3420±55^{a}	1701±20^{a}
0,00	1,00	0,00	1262±68^{e}	5394±387^{e}	1151±36^{d}	1381±37^{d}	622±8^{d}
0,00	0,00	1,00	458±28^{f}	2237±253^{g}	693±123^{f}	1404±18^{f}	312±9^{f}
0,50	0,50	0,00	2795±220^{b}	12852±600^{c}	2311±222^{b}	3083±39^{b}	1597±56^{b}
0,50	0,00	0,50	2475±97^{c}	11805±1,000^{c}	2012±27^{c}	2268±88^{c}	1573±83^{b}
0,00	0,50	0,50	767±105^{f}	3983±76^{f}	905±37^{e}	1433±22^{e}	531±8^{e}
0,333	0,333	0,333	2059±340^{d}	10213±511^{d}	1903±10^{c}	2701±84^{c}	1273±32^{c}
P-valor (homoscedasticidade)[1]			0,18	0,06	0,43	0,66	0,11
P-valor (ANOVA) [2]			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: [1]Valores de probabilidade obtidos pelo Teste de Hartley para homogeneidade das variâncias; [2]Valores de probabilidade obtidos pela análise de variância unifatorial. Diferentes letras na mesma coluna representam resultados diferentes ($p<0,05$) de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

Com os resultados obtidos pela determinação do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante *in vitro* obteve-se o MSR, onde para os modelos utilizados para o teor dos compostos fenólicos totais, capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu, CRT, DPPH• e FRAP, pode-se observar que a combinação erva-mate/erva-cidreira, com a erva-mate em uma concentração maior, possibilitaria uma maior extração de compostos fenólicos totais. Após a obtenção dos modelos matemáticos realizou-se a otimização utilizando-se dos modelos gerados para a

capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu, FRAP, CRT e compostos fenólicos totais. Pelas 100 iterações realizadas obteve-se um valor aproximado de 70% de erva-mate e 30% de erva-cidreira. O extrato otimizado não apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. O extrato otimizado apresentou ácido 2,4-di-hidroxibenzoico, ácido 2,5-di-hidroxibenzóico, ácido 3,4-di-hidroxi-benzóico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido siríngico, apigenina, coniferaldeido, cumarina, epicatequina, hesperidina, isoquercetrina, kaempferol, luteolina, naringina, ácido p-cumarico, pinocembrim, quercetina, rutina, sinapaldeido e siringaldeido.

Conclusões

A metodologia de superfície de resposta foi capaz de descrever matematicamente a o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante de misturas de três ervas amplamente consumidas no mundo. A formulação que apresentou maior teor de fenólicos totais e atividade antioxidante continha 70% de erva-mate e 30% de erva-cidreira.

Referências

BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERKER, K. I., OLGUN, F. A. O., OZYURT, D., DEMIRATA, B., APAK, R. Modified Folin−Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 4783-4791, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, 28, 25-30, 1995.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CRAIG, W.J. Health-promoting properties of common herbs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 491S–499S, 1999.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

GRANATO, D.; GRAVINK, R.; ZIELINSKI, A. A. F.; NUNES, D. S.; VAN RUTH, S. M. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 10283-10296, 2014.

MARGRAF, T.; KARNOPP, A. R.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397-C2403, 2015.

SERAGLIO, S. K. T. Desenvolvimento e validação analítica para determinação de compostos fenólicos utilizando LC-ESI-MS/MS, bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2016. 137p.