

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Dylan Mehler Hoffmann

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E ÁCIDO  
CLOGÊNICO EM ERVA-MATE POR HPLC-DAD E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS  
2023

Dylan Mehler Hoffmann

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM  
ERVA-MATE POR HPLC-DAD E UHPLC-MS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Química Bacharelado da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,  
RS), como requisito parcial para a obtenção de  
título de **Bacharel em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS  
2023

Dylan Mehler Hoffmann

**DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM  
ERVA-MATE POR HPLC-DAD E UHPLC-MS/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção de título de **Bacharel em Química**.

Avaliado por:

---

**Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Adriana Zambenedetti Gehm (UFSM)**  
(Doutora)

Santa Maria, RS  
2023

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da graduação.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, pelo ambiente criativo e amigável que proporciona.

Ao meu professor orientador, Prof. Dr. Renato Zanella, pela oportunidade, conhecimento compartilhado, contribuições valiosas para a minha jornada acadêmica e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao meu professor Dr. Valderi Luiz Dressler, por todos os ensinamentos ao longo da graduação, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus pais Carla e Rodrigo, por todo apoio, amor, confiança e liberdade que me propuseram durante a jornada acadêmica. Por serem exemplos de profissionais e pessoas de bondade. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

A todos os colegas/amigos do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), pelas trocas de conhecimento, amizade, apoio e companheirismo.

Ao meu amigo e futuro colega de profissão, Arthur Burg, pela amizade, parceria, risadas, auxílio durante os semestres da faculdade e por tornar a graduação memorável.

As minhas amigas Ana e Cristiane, pela amizade, parceria, risadas e por estarem sempre presentes me incentivando e apoiando.

À minha namorada Diuliana, pela compreensão, apoio, incentivo, paciência, conselhos, amor e por me acalmar nos momentos de ansiedade e estresse. Sem você ao meu lado este trabalho não seria concluído.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente em minha formação e para a realização desse trabalho e não foram citados, o meu muito obrigado!

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM ERVA-MATE POR HPLC-DAD E UHPLC-MS/MS

AUTOR: Dylan Mehler Hoffmann

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), é um produto muito consumido no sul da América do Sul, principalmente no sul do Brasil, que é um dos maiores produtores da mesma. Ela pode ser consumida de diversas formas, mas a principal é o chimarrão, a qual usa água quente sobre a erva em um recipiente (cuia), sugando o líquido por um canudo (bomba). Estudos mostram que a erva-mate possui diversos benefícios ao ser humano, os quais são atribuídos aos compostos fenólicos como ácido clorogênico e as metilxantinas, como a cafeína e a teobromina. Neste trabalho, foi realizado a quantificação total dos três compostos empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) após extração com metanol assistida por ultrassom. A calibração do equipamento foi feita utilizando soluções padrão dos compostos em diferentes concentrações, obtendo-se um limite de detecção (LD) de 0,00016 mg/L e de quantificação (LQ) de 0,0005 mg/L. Foram avaliados diferentes tempos de extração no ultrassom, bem como as diferenças entre hidratação e não hidratação prévia das amostras para a concentração de cafeína. Após isso, comparou-se os resultados obtidos por HPLC-DAD e por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS), obtendo-se resultados similares. O LOD e LOQ do UHPLC-MS/MS foram de 0,0003 e 0,001 µg/L para teobromina e cafeína, e 0,0006 e 0,002 µg/L para o ácido clorogênico respectivamente. A cafeína foi o composto de maior concentração na maioria das amostras, seguido do ácido clorogênico e teobromina, com valores médios de 10,065, 6,845 e 2,640 mg/g, respectivamente.

**Palavras-chave:** Erva-mate; Cromatografia Líquida; Preparo de amostra

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF CAFFEINE, THEOBROMINE AND CHLOROGENIC ACID IN YERBA MATE HPLC-DAD AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Dylan Mehler Hoffmann

ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a very consumed product in the south of South America, mainly in the south of Brazil, which is one of the largest producers of it. It can be consumed in several ways, but the main one is chimarrão, which uses hot water over the herb in a container (cuia), sucking the liquid through a straw (bomb). Studies show that yerba mate has several benefits for humans, which are attributed to phenolic compounds such as chlorogenic acid and methylxanthines, such as caffeine and theobromine. In this work, the total quantification of the three compounds in HPLC-DAD using the ultrasound-assisted inheritance method was performed. The treatment of the equipment was done using standard solutions of the three compounds was performed using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) after ultrasound-assisted extraction with methanol. The equipment calibration was performed using standard solutions in different concentrations. Different extraction times were evaluated using ultrasound, as well as differences between prior hydration and non-hydration of samples for caffeine concentration. After that, the results obtained by HPLC-DAD and by Ultra-High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) were compared, obtaining similar results. Caffeine was the compound with the highest concentration in most samples, followed by chlorogenic acid and theobromine, with mean values of 10,065, 6,845 and 2,640 mg/g, respectively.

Keywords: Yerba mate; Liquid Chromatography; Sample preparation

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
DAD	Detector com Arranjos de Diodos
EUA	Estados Unidos da América
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FN	Fase Normal
FR	Fase Reversa
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Arranjo de Diodos)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MS/MS	Espectrômetro de massas em tandem
PAM	Produção Agrícola Municipal
RS	Rio Grande do Sul
UHPLC-MS/MS	Ultra-High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série)
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma do processamento da erva-mate.....	15
Figura 2- Estrutura principal dos compostos presentes na erva-mate. ....	17
Figura 3-Molécula de cafeína. ....	17
Figura 4-Molécula de Teobromina .....	18
Figura 5-Éster cinamato e molécula de ácido clorogênico .....	19
Figura 6-Esquema de funcionamento do detector de arranjo de diodos.....	22
Figura 7-Curvas analíticas e espectro de absorção de cada padrão .....	26
Figura 8-Cromatograma de todos os pontos da curva analítica.....	27
Figura 9-Gráfico do tempo de extração pela concentração de cafeína obtida.....	28
Figura 10-Gráfico da diferença da concentração de cafeína entre amostras hidratadas e não hidratadas.....	29
Figura 11-Extrato das amostras 1 a 15 de erva-mate.....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados de área plantada e total de produção de Erva-Mate no Brasil e Rio Grande do Sul.....	14
Tabela 2- Parâmetros de avaliação e resultados da curva analítica no HPLC-DAD.....	25
Tabela 3- Parâmetros avaliados e resultados obtidos para curva analítica por UHPLC-MS/MS. .....	27
Tabela 4- Resultados obtidos dos compostos realizados nas amostras de Erva-Mate .....	31

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	12
<b>3 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>12</b>
3.1 ERVA-MATE.....	12
<b>3.1.1 Processamento da erva-mate .....</b>	<b>14</b>
3.2 COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NA ERVA-MATE .....	15
<b>3.2.1 Cafeína.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.2 Teobromina .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.3 Ácido Clorogênico .....</b>	<b>18</b>
3.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA ERVA-MATE .....	19
3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DA ERVA-MATE .....	19
3.5 TÉCNICAS DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA .....	20
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	22
<b>4.1.1 Materiais diversos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.2 Equipamentos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.3 Reagentes, soluções e amostras .....</b>	<b>23</b>
4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	23
<b>4.2.1 Preparo da curva analítica .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.2 Preparo da amostra .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.3 Condições cromatográficas .....</b>	<b>24</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
5.1 CURVAS ANALÍTICAS .....	25
5.2 PARÂMETROS OTIMIZADOS.....	27
5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	29
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa da América do Sul, principalmente nos países mais ao sul, como Argentina, Paraguai, Uruguai e o sul do Brasil, sendo este o maior produtor da planta. É uma árvore que cresce de 8 a 15 metros, podendo ser cultivada em lavouras ou de forma nativa. Suas folhas e pequenos ramos trituradas e secas, podem ser consumidas como bebida fria, no tereré, ou como bebida quente, no chá mate ou no principal e mais consumido, o chimarrão. A erva-mate tem outras utilidades, como na preparação de energéticos, alimentos, e também em cosméticos e produtos de limpeza (MATEOS et al., 2018; HECK E MEIJA, 2007; CROGE, CUQUEL, PINTRO, 2020).

No último estudo feito pelo IBGE, o Brasil foi o maior produtor de erva-mate do mundo, e a Argentina o maior exportador do produto. O Rio Grande do Sul foi o maior produtor do Brasil, com mais de 230 mil toneladas produzidas. A produção dessa planta também é forte no Paraná, Santa Catarina, e aos poucos no Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2019; CARDOZO et al., 2021).

O consumo de erva-mate é de longa data, desde o uso de infusões das folhas pelos jesuítas até nos dias atuais, com as folhas e pequenos ramos processados finamente. O alto consumo se deve as atividades benéficas que a bebida tem no corpo humano, que ocorre pela presença de compostos bioativos presentes na erva-mate, e por conta disso, vários estudos tem sido feitos para tentar entender a funcionalidade destas atividades, que podem ser antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiobesidade, também possuindo ação sobre o sistema nervoso central (GAWRON-GZELLA, CHANAJ-KACZMAREK, CIELECKA-PIONTEK, 2021; CROGE, CUQUEL, PINTRO, 2020).

O que causa os efeitos benéficos ao ser humano, são os compostos bioativos presentes na erva-mate, dentre eles dois grupos se destacam, as xantinas, onde se enquadram a cafeína e a teobromina, que tem ação sobre o sistema nervoso central, e os polifenóis, sendo o principal constituinte desse grupo o ácido clorogênico, que possui atividades antioxidantes, hipoglicemiantes, antivirais e hepatoprotetoras (VASCONCELLOS, 2022; GAWRON-GZELLA, et al., 2021; CROGE, et al., 2020).

Tendo em vista a concentração alta dos compostos bioativos na erva-mate, este trabalho visou a quantificação total de cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), assim

como teobromina e ácido clorogênico. Para isso estudou-se diferentes tempos extração assistida por ultrassom, e também se uma hidratação precedente da amostra seria eficaz para uma melhor extração, e por fim comparou as concentrações dos compostos analisados no HPLC-DAD com um UHPLC-MS/MS.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho de conclusão de curso é determinar a concentração total de cafeína, teobromina e ácido clorogênico em amostras de erva-mate por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- Comparar diferentes tempos de extração dos analitos em ultrassom;
- Comparar resultados com hidratação prévia das amostras e sem hidratação.
- Quantificar os analitos nas amostras por cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) com analisador triplo quadrupolo.

## **3 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA**

### **3.1 ERVA-MATE**

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tem sido amplamente estudada nos últimos anos devido a seus efeitos benéficos a saúde humana, como por exemplo ação antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antiobesidade e também funções cardioprotetoras. Esses efeitos ocorrem devido a presença de alcaloides, polifenóis, terpenos e óleos essenciais na composição da erva-mate (JUARIST-GÓMEZ, et al., 2018; HECK E MEIJA, 2007).

A erva-mate é uma árvore nativa ou cultivada principalmente na América Latina, sendo de grande abundância no norte da Argentina, sul do Brasil, Uruguai e Paraguai. Essa árvore foi

descrita a primeira vez em 1822 pelo naturalista francês Auguste de Sant-Hilaire, é da família das Aquifoleaceae, podendo alcançar de 8 a 15 metros de altura. Porém, os primeiros registros do uso da erva-mate no seu habitat natural no Brasil são dos índios Guarani, já o cultivo e comércio começou com os jesuítas que adentraram a região sul do país no século XVI, fazendo uma bebida com as folhas da árvore, que ficou conhecida como chá jesuíta, missionário ou paraguaio. Depois disso, diversas outras tribos da América passaram a consumir a bebida, tais como os Ameríndias e Caingangues (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; CROGE *et al.*, 2020).

As folhas secas e trituradas da erva-mate são usadas para preparar uma bebida muito famosa na América Latina, e conhecida no Brasil como chimarrão. Essa bebida é preparada geralmente colocando-se cerca de 50 gramas de erva em um recipiente de madeira chamado “cuia” junto de água quente, e é bebido usando um canudo metálico conhecido por “bomba”. A erva-mate que chega ao consumidor para ser usada na preparação do chimarrão, deve passar por diversos processos de produção, como colheita, torrefação, secagem, moagem, maturação, peneiração e embalagem (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; HECK E MEJIA, 2007).

O Brasil é o maior produtor de erva-mate do mundo, produzindo mais de 500 mil toneladas por ano desde 2012, seguido da Argentina que é o maior exportador e Paraguai. O Rio Grande do Sul (RS) se destaca entre os estados produtores brasileiros, sendo o maior produtor, cerca de 45% da produção anual, segundo pesquisa feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e divulgada no relatório da Produção Agrícola Municipal (PAM), esses dados são apenas da produção de erva-mate que vem do plantio de ervais, não de florestas nativas. No Brasil, Paraná e Santa Catarina também são fortes produtores de erva-mate. O RS também é o principal exportador do Brasil, exportando para países como Chile, EUA, Alemanha e Uruguai (RIO GRANDE DO SUL, 2022; SILVA *et al.*, 2022).

Tabela 1- Dados de área plantada e total de produção de Erva -Mate no Brasil e Rio Grande do Sul

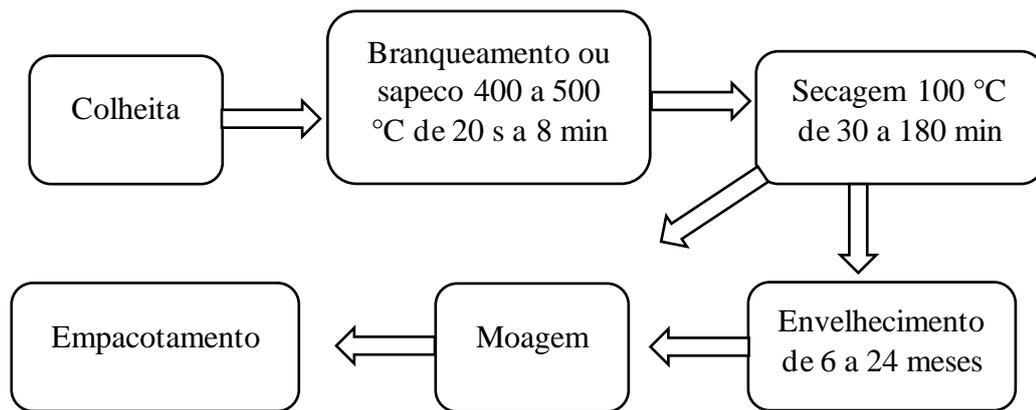
Ano	Brasil		Rio Grande do Sul	
	Área plantada (hectares)	Quantidade produzida (toneladas)	Área plantada (hectares)	Quantidade produzida (toneladas)
2010	71.391	430.305	30.678	260.413
2011	71.344	443.635	30.840	272.719
2012	82.945	513.256	35.000	260.866
2013	74.421	515.451	34.909	265.515
2014	77.645	602.559	35.240	276.232
2015	74.494	602.929	33.222	292.416
2016	78.621	630.556	33.445	297.141
2017	75.947	619.771	30.780	302.000
2018	71.419	509.949	28.948	232.971
2019	70.305	522.259	28.022	233.434
2020	72.122	527.546	27.413	214.552

Fonte: IBGE Produção Agrícola Municipal (2019).

### 3.1.1 Processamento da erva-mate

As folhas e galhos de erva-mate são colhidos e levados até o local de processamento, passando primeiramente pelo processo de branqueamento ou *sapeco*, onde ocorre a inativação enzimática oxidativa pela enzima polifenol oxidase, além da remoção do excesso da umidade pelo aquecimento em fornos rotativos, em temperaturas de 400 a 500 °C por um tempo que pode variar de 20 s a 8 min. Após isso, a erva vai para secagem em temperaturas próximas a 100 °C permanecendo de 30 min a 180 min, até a folha ficar com uma textura quebradiça e crespa. Depois da secagem, a erva pode ir para a moagem, maturação ou torrefação, dependendo do tipo de erva-mate que se deseja obter. A maturação, também chamada de envelhecimento, ocorre em câmaras de cimento ou madeira por 6 a 24 meses, esse processo é usado para aumentar o teor de metil xantinas e compostos fenólicos, que dão sabor específico a erva-mate, e conseqüentemente aumenta a atividade antioxidante. A torrefação ocorre em temperaturas de aproximadamente 120 °C por 15 min, o produto após esse processo é usado para fazer o chá mate. A moagem ou cancheamento é o último processo antes do produto ser embalado, tendo três tipos de moagem, a grossa, média e a fina. Após esse processo a erva-mate está pronta para uso e é embalada para comercialização. (CARDOZO *et al.*, 2021).

Figura 1- Fluxograma do processamento da erva-mate



Fonte: Autor (2023).

### 3.2 COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NA ERVA-MATE

Na erva-mate são encontrados vários compostos químicos, sendo nutrientes como carboidratos, proteínas e gorduras, e também diversos metabólitos secundários, sendo a maioria alcaloides purínicos, polifenóis e terpenos, vitaminas e minerais também tem uma concentração considerável (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021).

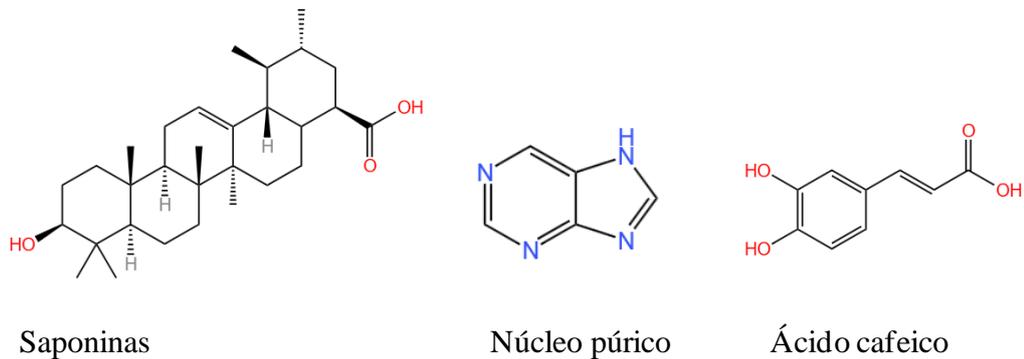
O grupo de compostos que tem recebido grande atenção nos últimos tempos é dos alcaloides purínicos, devido a seus efeitos estimulantes nas bebidas que os contém. Dentre os alcaloides encontrados na erva-mate, especialmente nas folhas, as metilxantinas são as que mais se destacam, tendo em seu grupo a cafeína e a teobromina, que tem uma faixa de concentração de 6-70 mg/g, 0,5-10 mg/g, respectivamente. Além desses dois compostos, também é encontrado traços de teofilina, que pode ser um intermediário no catabolismo da cafeína na planta. Esses compostos são os principais no que diz respeito aos efeitos estimulantes no sistema nervoso central e ao gosto amargo das bebidas, e podem sofrer variações dependendo do processamento pelo qual a erva passa (ISOLABELLA *et al.*, 2010; GAWRON-GZELLA, *et al.*, 2021; CROGE *et al.*, 2020; HECK e MEIJA, 2007).

Outro grupo de compostos que está presente na erva-mate e que têm efeitos benéficos à saúde é dos compostos fenólicos. Representa de 7 a 10% de massa da folha seca. Os hidroxicinamatos compõem grande parte dos compostos fenólicos formados principalmente de ácidos quínicos e derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido ferúlico, ácidos p-cumáricos e ácidos cafeicos), totalizando cerca de 95% do teor de compostos fenólicos, sendo os 5% restantes rutina, quercetina, entre outros (VASCONCELLOS *et al.*, 2022; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021).

Os derivados do ácido cafeico funcionam como precursores biossintéticos e representam uma importante fração dos hidroxicinâmicos, sendo o principal composto dessa família presente na erva-mate, o ácido clorogênico (ácido cafeoilquínico), e sua concentração pode variar de 46-81  $\mu\text{g}/\text{mg}$  nas folhas secas da erva-mate. Marques e Farah realizaram um estudo comparando a concentração de ácido clorogênico em chimarrão e diversos chás, encontrando concentrações 60 e 20 vezes maiores na bebida com erva-mate do que em chá-verde e chá-preto, sendo assim, o chimarrão é uma rica fonte de ácido clorogênico e seus derivados. Esses compostos fenólicos também são encontrados em diversos vegetais, com diferentes composições (VASCONCELLOS *et al.*, 2022; MARQUES e FARAH, 2009; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021).

Outro grupo de compostos presentes na erva-mate são as saponinas, elas têm um gosto amargo e são altamente solúveis em água. Também são conhecidas como saponinas triterpenóides, que deriva do ácido ursólico, tendo as saponinas mate 1, 2, 3, 4 e 5. No geral, encontram-se em uma concentração de aproximadamente 7  $\text{mg}/\text{g}$  na erva-mate (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021). A erva-mate também é rica em vitaminas e minerais, contendo em sua composição vitaminas C, B1, B2 e B6, e macronutrientes como potássio, cálcio, magnésio e fósforo. Em pequenas quantidades também estão presentes vitaminas A e E, assim como manganês e ferro. Elementos tóxicos algumas vezes, são encontrados na erva-mate, entre eles o cádmio, antimônio, arsênio e chumbo (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; POZEBON *et al.*, 2015). O processo de torrefação, que leva ao chá mate, acaba acarretando mudanças nos compostos dos óleos essenciais, como por exemplo a redução do teor de limoneno, que é responsável pelo aroma floral da bebida, assim como a oxidação de linalol. Porém, também se formam novos compostos, como metilfurfural e o furfural, que dão sabor doce e defumado. Vale ressaltar que todos esses compostos citados acima podem variar dependendo da forma como a erva-mate foi processada, assim como fatores como clima, solo, região, entre outros (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; CARDOZO *et al.*, 2021).

Figura 2- Estrutura principal dos compostos presentes na erva -mate.

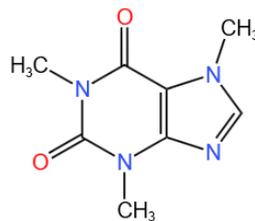


Fonte: Autor (2023)

### 3.2.1 Cafeína

A cafeína, também chamada de 1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona pela IUPAC, tem fórmula molecular  $C_8H_{10}N_4O_2$ , e sua massa é de 194,19 g/mol. Em condições normais de temperatura e pressão (CNTP) é um pó branco, tem gosto amargo, e sua temperatura de fusão é de 236,2 °C. Solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona e clorofórmio, e seu pKa é igual a 14. A cafeína absorve radiação eletromagnética na região do ultravioleta, nos comprimentos de onda de 227, 225 e 274 nm. A cafeína é a principal responsável pelo efeito estimulante das bebidas feitas de infusão de erva-mate e é um alcaloide purínico, encontrado em grandes concentrações em chás e no café (PUBCHEM, 2023).

Figura 3-Molécula de cafeína.



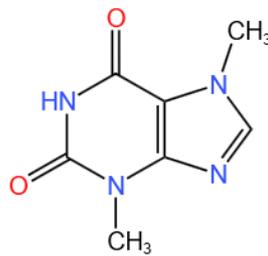
Fonte: Autor (2023)

### 3.2.2 Teobromina

A teobromina, cujo nome descrito pela IUPAC é 3,7-dimetilpurina-2,6-diona, tem fórmula molecular  $C_7H_8N_4O_2$  e massa de 180,16 g/mol. Sua forma pura é de um pó branco ou

agulhas monoclinicas, tem temperatura de fusão na faixa de 357°C. Diferente da cafeína, a teobromina é pouco solúvel em água, sendo solúvel em etanol, também tem gosto amargo e seu pKa é de 9,9. Uma única substituição do grupo metila (CH<sub>3</sub>) da cafeína, pelo hidrogênio na teobromina, altera o pKa e a polaridade da molécula. Absorve radiação ultravioleta na faixa de 272 e 247 nm, valor muito próximo ao da cafeína. A teobromina é um alcaloide purínico, muito encontrado no cacau e conseqüentemente no chocolate, atua como vasodilatador e estimulante (PUBCHEM, 2023)

Figura 4-Molécula de Teobromina

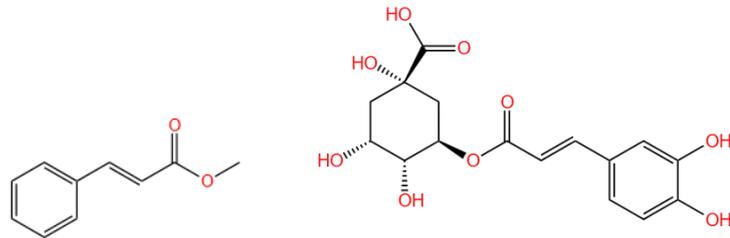


Fonte: Autor (2023)

### 3.2.3 Ácido Clorogênico

O ácido clorogênico tem o nome descrito pela IUPAC de ácido (1S, 3R, 4R, 5R) -3-[(E)-3-(3,4-di-hidroxifenil) prop-2-enoil] oxi-1,4,5-tri-hidroxiciclohexano-1-carboxílico, ou também por ácido 5-o-caffeoilquinico, tem massa molar de 354,31 g/mol, e sua fórmula estrutural é C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>. É um sólido branco solúvel em água, cuja temperatura de fusão é de 205 a 209 °C, tem absorção máxima de radiação ultravioleta no comprimento de onda de 325 nm e pKa 3,9. O ácido clorogênico é um éster cinamato, metabólito intermediário da biossíntese de lignina, que fornece proteção e realiza o transporte de água e nutrientes nas plantas. Tem boa atividade antioxidante, que tem sido muito estudada principalmente no tratamento contra câncer (PUBCHEM, 2023; GIL e WIANOWSKA, 2017).

Figura 5-Éster cinamato e molécula de ácido clorogênico



Fonte: Autor (2023).

### 3.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA ERVA-MATE

A erva-mate possui diversos efeitos fisiológicos a saúde e que vem sendo estudados nos últimos tempos, mas que fizeram e fazem parte de diversas culturas desde sua descoberta. Os efeitos estimulantes são os que recebem maior atenção por serem os mais conhecidos entre os consumidores de bebidas à base de erva-mate, esse efeito é causado principalmente por conta da cafeína e da teobromina, que tem ação sobre o sistema nervoso central, fazendo com que o indivíduo fique ativo, evitando a fadiga física e mental. Além disso, estimula o coração e os músculos, fazendo com que ocorra maior absorção de oxigênio pelos tecidos, acelerando o metabolismo (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; CARDOZO *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2006).

Atividade antioxidante, hipoglicemiantes, antivirais e hepatoprotetoras da erva-mate também tem sido estudadas, e vários estudos *in vitro* e *in vivo* mostram o potencial antioxidante dos compostos fenólicos, dentre eles o ácido clorogênico e seus derivados, que ajudam a reduzir o risco de doenças causadas pelo estresse oxidativo, que ocorre principalmente pela formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além dessas atividades, a erva-mate também possui atividades antimicrobianas, antiobesidade, anti-inflamatória e antimutagênica (RIACHI e MARIA, 2017; GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021; CARDOZO *et al.*, 2021).

### 3.4 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DA ERVA-MATE

A extração de compostos de uma matriz sólida, é uma parte de suma importância na análise quantitativa, visto que uma boa extração fornece uma quantificação mais confiável dos analitos de interesse. Esse processo também está sujeito a perdas de analito e contaminações externas. Por conta disso, o método de extração deve levar em conta alguns fatores como seletividade e polaridade dos analitos, quantidade e toxicidade do solvente, tempo de extração, entre outros. Os solventes mais usados para extração de compostos orgânicos em matrizes sólidas são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, acetonitrila, entre outros (BIESAGA, 2011).

Na literatura, encontra-se diversas formas de extração de compostos fenólicos e metilxantinas da erva-mate, como extração aquosa a quente, extração assistida por micro-ondas, fluido supercrítico, extração por ultrassom, entre outras. Porém a principal forma de extração desses compostos em erva-mate é por infusão aquosa, visto que se assemelha a forma mais comum de consumo da matriz, o chimarrão (MEINHART *et al.*, 2010; KALTBACH *et al.*, 2022).

Um método de extração comumente usados em laboratórios de pesquisa é o ultrassom, cujo princípio básico envolve a aplicação de ondas ultrassônicas de alta frequência à amostra sólida imersa em um solvente adequado. Essas ondas ultrassônicas geram cavitação acústica, ou seja, a formação e implosão rápida de pequenas bolhas de gás no solvente. Esse fenômeno cria turbulência e agitação intensas na amostra, promovendo a ruptura das células e a liberação dos analitos desejados (BENDICHO *et al.*, 2012; BIESAGA, 2011).

Existem vários métodos descritos na literatura para identificar e quantificar cafeína, teobromina e ácido clorogênico, porém a maioria o faz separadamente, como é o caso da gravimetria, espectrofotometria no UV-VIS e infravermelho, porém, pode-se quantificar todos em uma mesma matriz ao mesmo tempo utilizando cromatografia líquida ou gasosa, ou eletroforese capilar. Esses últimos métodos são amplamente usados e fornecem respostas seletivas e sensíveis (MARIA e MOREIRA, 2004).

### 3.5 TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) é uma técnica analítica utilizada para separar compostos orgânicos, vitaminas, agroquímicos, metabólitos, fármacos, entre outros. Essa separação ocorre quando os compostos são distribuídos entre a fase estacionária (FE), que geralmente é um adsorvente, com

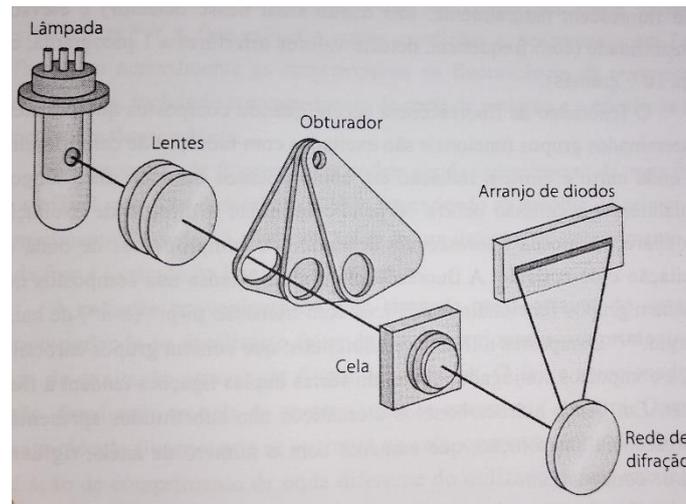
uma grande área superficial empacotado em uma coluna, e a fase móvel (FM), a qual é um fluido que é bombeado pela FE com os analitos, fazendo com que eles interajam com a mesma, assim conseguindo-os separar de acordo com as diferentes polaridades. Essa técnica é amplamente usada em outros campos além da química, como nas ciências ambientais, farmacologia, alimentos e muitos outros, por conseguir separar compostos com propriedades semelhantes em diferentes matrizes (LANÇAS, 2016; HARRIS, 2017)

A FE na HPLC, tem um tamanho de partícula muito pequena, entre 2 e 5  $\mu\text{m}$ , o que permite uma boa interação com os analitos, além do uso de altas pressões (4000 a 6000 psi), que aumentam a velocidade do fluxo da FM e melhoram a resolução e eficiência de separação. A FE mais usual em cromatografia líquida moderna são os óxidos de sílica (sílica-gel) e alumina, cujos elementos são os mais abundantes da crosta terrestre (LANÇAS, 2016)

Pode-se preparar colunas com uma ampla faixa de polaridade, quando se prepara FE com grupamentos polares, como grupos ciano ou amino, se diz que o sistema é usado em Fase Normal (FN), com a FM sendo solventes mais apolares, como hexano, diclorometano ou éter de petróleo. Do contrário, quando a FE é mais apolar, com grupamentos octadecil (C-18), octil (C-8) ou hexil (C-6), está sendo usado um processo de Fase Reversa (FR), o qual utiliza eluentes mais polares, como metanol, acetonitrila e água. O processo pode variar dependendo do analito que se está querendo analisar, sendo a polaridade o fator mais importante para escolha do processo (LANÇAS, 2016; HARRIS, 2017).

Quanto a detecção dos analitos depois separados na coluna, pode ocorrer de várias formas, como pelo índice de refração, espalhamento da luz, absorção de luz UV-VIS, fluorescência, eletroquímica ou por espectrometria de massas. A absorção da luz no UV-VIS utiliza um detector de arranjo de diodos baseado na espectroscopia de absorção de luz o qual tem uma matriz de diodos para registrar o espectro de absorção em uma ampla faixa de comprimentos de onda. Ele é composto por uma fonte de luz, uma célula de fluxo, um arranjo de diodos sensíveis à luz e um sistema de detecção eletrônica. A luz emitida pela fonte passa pela célula de fluxo, onde a amostra é introduzida, e depois atinge os diodos. Os diodos são sensíveis à luz em diferentes faixas de comprimentos de onda, permitindo a obtenção de informações espectrais detalhadas (LANÇAS, 2016; HARRIS, 2017).

Figura 6-Esquema de funcionamento do detector de arranjo de diodos.



Fonte: Lanças (2016)

O UHPLC-MS/MS utiliza partículas de fase estacionária ainda menores, abaixo de 2  $\mu\text{m}$  e opera em pressões ainda mais elevadas do que o HPLC convencional (15000 psi), resultando em separações mais rápidas e eficientes. A espectrometria de massas em tandem é capaz de fornecer informações estruturais e de massa de íons específicos, o que permite a identificação precisa e seletiva dos analitos. A sensibilidade do MS/MS também é muito maior que o DAD, permitindo a detecção de níveis mais baixos de concentração, até a faixa de picogramas. O MS/MS gera íons pela fragmentação dos compostos em fase gasosa, que posteriormente são separados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e detectados, gerando espectros com a abundância relativa de cada fragmento, que é característico de cada composto que está sendo analisado (ROCCA *et al.*, 2017; PEREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2017).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

#### 4.1.1 Materiais diversos

Para realização dos ensaios cromatográficos, foi utilizado tubos Falcon de polipropileno de 50 mL, pipetadores automáticos de volume variável, filtros de nylon de 13 mm e porosidade

de 0,22  $\mu\text{m}$  (Nova Analítica, Brasil), béqueres de vidro, seringa de 1 mL, provetas de 25, 50 e 100 mL, frascos de vidro, capacidade de 4, 100, 200 e 500 mL.

#### 4.1.2 Equipamentos

Para realização dos ensaios experimentais, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- a) Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos da Varian ProStar modelo 210;
- b) Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência acoplado à espectrômetro de massas em série, modelo Xevo TQ-XS, da marca Waters.
- c) Coluna C18 da marca Restek (250 x 4,6 mm) tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ ;
- d) Coluna C18 Waters (50 x 2,1 mm) tamanho de partícula 1,7  $\mu\text{m}$ ;
- e) Agitador Vortex da marca ION-VX38.
- f) Balança analítica da Shimadzu UX-420H.
- g) Ultrassom da marca Bandelin Sonorex RK-510.
- h) Centrífuga da marca Novatecnica NT-825.

#### 4.1.3 Reagentes, soluções e amostras

Os reagentes utilizados nesta pesquisa para o preparo de soluções e extração das amostras foram:

- a) Água ultra purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV<sup>®</sup> resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm (Millipore, França);
- b) Ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ )  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich, EUA);
- c) Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- d) Padrão sólido de cafeína 99% (Sigma Aldrich, EUA)
- e) Padrão sólido de ácido clorogênico 95% (Sigma Aldrich, EUA)
- f) Padrão sólido de teobromina 99% (Sigma Aldrich, EUA)
- g) As amostras de erva-mate foram trazidas da região de Ilópolis-RS.

## 4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.2.1 Preparo da curva analítica

As curvas analíticas foram preparadas a partir de padrões sólidos dos compostos diluídos em H<sub>2</sub>O:metanol 1:1 nas concentrações corrigidas de 1006, 1004 e 999,43 mg/L de cafeína, teobromina e ácido clorogênico, respectivamente. Essas soluções padrão foram diluídas para concentração de 100 mg/L, e a partir destas, foram preparadas soluções com todos os compostos juntos para preparar os pontos da curva com concentrações de 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 mg/L, que foram usados para calibração do HPLC-DAD. O ponto de 10 mg/L, foi diluído para 0,1 mg/L este, foi então diluído para obter os pontos de 1, 2, 5, 10 e 20 µg/L, os quais foram usados no UHPLC-MS/MS. Ambas as curvas foram diluídas somente com água ultrapura.

#### **4.2.2 Preparo da amostra**

As amostras de erva-mate de 1 a 15, foram pesadas em massas próximas de 0,5 g em tubos Falcon de polipropileno. Após isso foi adicionado 5 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura para hidratação, deu-se uma leve agitação para que a água entrasse em contato com toda a amostra e depois de 5 min, 20 mL de metanol, totalizando 25 mL, então todas foram agitadas em vórtex por 1 min. As amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 90 min em uma temperatura média de 45 °C, posteriormente foram centrifugadas por 8 min a 2732 g. Diluídas 20x, as amostras foram injetadas no HPLC-DAD, em sistema com filtragem já na injeção. Já para análise no UHPLC-MS/MS, o extrato foi filtrado e diluído 20000x, visto que o equipamento é muito sensível e as amostras de erva-mate contém uma alta concentração dos compostos que foram analisados.

#### **4.2.3 Condições cromatográficas**

Para quantificação dos compostos no HPLC-DAD, foram usadas uma coluna C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm, quanto a fase móvel, foi utilizada uma proporção de solução 0,3% ácido fórmico: metanol 65:35, em uma vazão fixa de 0,8 mL/min com eluição isocrática. O volume de injeção foi de 20 µL e o tempo de análise 10 min. As análises foram feitas utilizando dois comprimentos de onda, em 275 nm, para cafeína e teobromina, e 325 nm para ácido clorogênico.

Nas análises feitas no UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS, foi utilizada uma coluna C18 (50 x 2,1 mm) com tamanho de partícula de 1,7 µm. A fase móvel consistia em uma eluição gradiente de (A) água e (B) metanol:acetonitrila 1:1, ambas contendo 0,1% ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio, iniciando com 5% de B até 3,5 min, quando mudou para 100 % de B, permanecendo até 4,5 min, retornando em 4,51 min para 5% de B, permanecendo até o fim da análise, que foi de 5 min. A vazão foi de 0,225 mL/min e o volume de injeção de 5 µL. As

transições analisadas foram 195,3>110, 195,3>138 com energia de colisão (EC) de 20 eV, interface do eletrospray (ESI) positiva e potência do cone de 25 V para cafeína. Para teobromina as transições analisadas foram 181>96 e 181>108, com uma EC de 22 eV, ESI positiva e potência de cone também em 25 V. Por último para o ácido clorogênico, foram analisadas as transições de 353>191 e 53>161 com EC de 22 eV, ESI negativo e potência de cone de 35 V.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

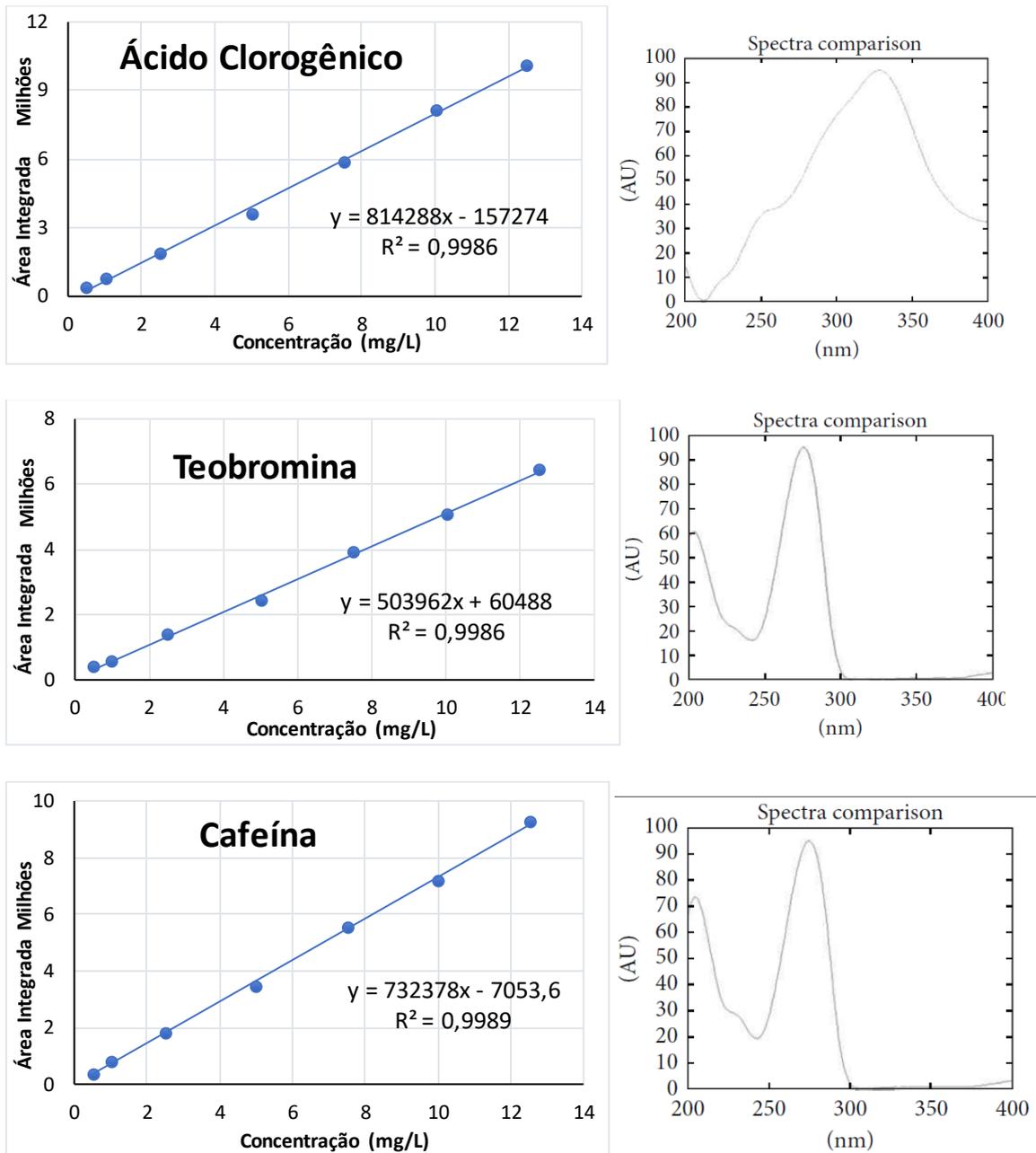
### 5.1 CURVAS ANALÍTICAS

As curvas analíticas foram construídas a partir de padrões e plotadas com base na área integrada dos picos de cada padrão pela concentração das soluções padrão. Na tabela a seguir encontram-se os valores obtidos em relação a linearidade da curva analítica obtida por HPLC-DAD na faixa de concentração de 0,5 a 12,5 mg/L.

Tabela 2- Parâmetros de avaliação e resultados da curva analítica no HPLC-DAD.

<b>Composto</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Comprimento de onda máx. (nm)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD (mg/L)</b>	<b>LOQ (mg/L)</b>
<b>Cafeína</b>	8,21	274	0,9989	0,00016	0,0005
<b>Teobromina</b>	4,46	272	0,9986	0,00016	0,0005
<b>Ácido Clorogênico</b>	6,62	324	0,9986	0,00016	0,0005

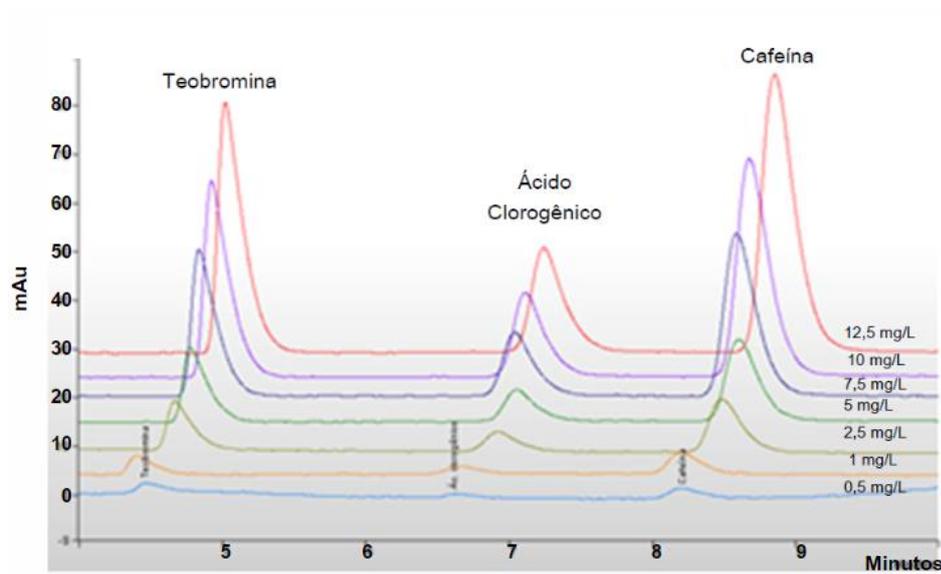
Figura 7-Curvas analíticas e espectro de absorção de cada padrão



Fonte: Autor (2023), Bojik (2013)

Abaixo, uma imagem da resposta linear dos padrões dos compostos analisados no comprimento de onda de 275 nm, onde o ácido clorogênico tem uma pequena absorção.

Figura 8-Cromatograma de todos os pontos da curva analítica



Fonte: Autor (2023).

Os dados da curva analítica no UHPLC-MS/MS também foram baseados na área integrada de cada pico dos padrões, na faixa de concentração de 1 a 20  $\mu\text{g/L}$ , porém, com o MS/MS, foi possível monitorar os íons formados por cada composto, como mostra a tabela a seguir.

Tabela 3- Parâmetros avaliados e resultados obtidos para curva analítica por UHPLC-MS/MS.

Compostos	$t_R$ (min)	ESI	Cone (V)	Transições (EC, eV)	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
Teobromina	1,49	+	25	181,0>96,0 (22)	0,9998	0,0003	0,001
				181,0>108,0 (22)			
Ácido Clorogênico	1,74	-	35	353,0>191,0 (22)	0,9999	0,0006	0,002
				353,0>161,0 (22)			
Cafeína	1,86	+	25	195,3>110,0 (20)	0,9994	0,0003	0,001
				195,3>138,0 (20)			

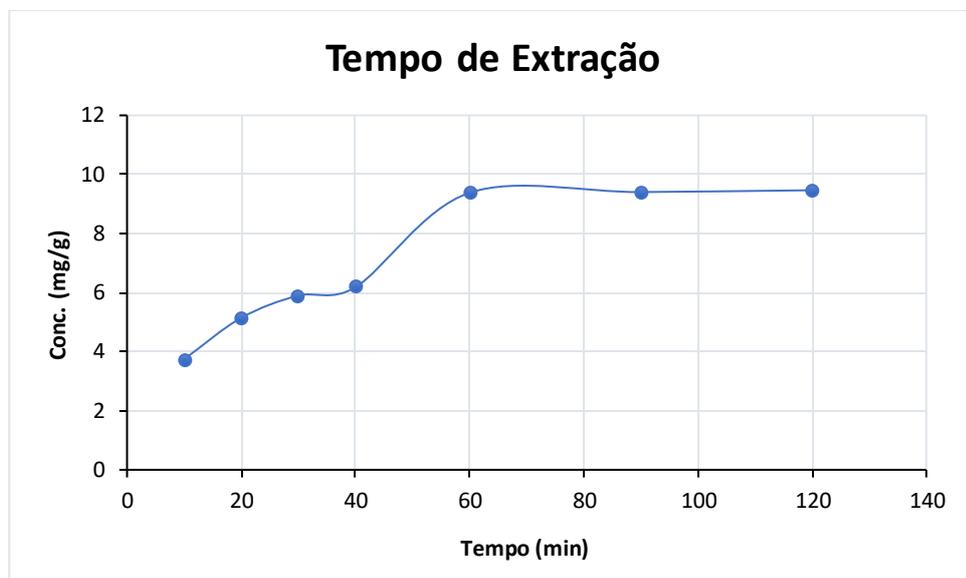
Fonte: Autor (2023).

## 5.2 PARÂMETROS OTIMIZADOS

Antes de realizar a quantificação das amostras, definiu-se os parâmetros de extração, como tempo no ultrassom, com ou sem hidratação prévia das amostras, com água ultrapura e acidificada, e também as condições cromatográficas, como vazão e proporção da fase móvel.

Primeiramente foram realizadas extrações assistidas por ultrassom nos tempos de 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 min com metanol, as quais foram injetadas no HPLC-DAD para analisar qual tempo de extração possui maior concentração de cafeína na amostra 10, que tinha uma maior quantidade em relação as outras que é o composto que tem melhor resposta e menos interferentes, obteve-se o gráfico a seguir:

Figura 9-Gráfico do tempo de extração pela concentração de cafeína obtida.

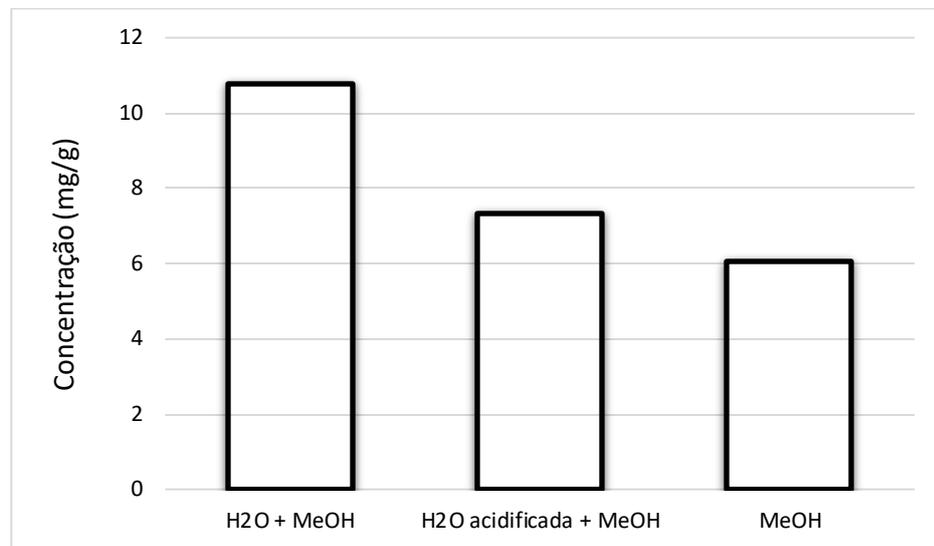


Fonte: Autor (2023).

O tempo de extração escolhido foi de 90 min, visto que a partir desse tempo a concentração pouco aumenta, e abaixo desse tempo, pode não extrair com eficiência os analitos. A temperatura média do ultrassom ficou em torno de 40,5 °C durante a extração.

Após definido o tempo de extração em 90 min, foi estudado se uma hidratação prévia das amostras de erva-mate seria efetiva ou não para melhor extração dos analitos, então foram separados 3 tubos com aproximadamente 0,5 g da amostra 10 em cada, onde foi realizada a hidratação somente com 5 mL água ultrapura, outra com 5 mL água acidificada a pH 3, depois de 5 min foi adicionado 20 mL de metanol em ambas, e o último somente com 25 mL de metanol. O resultado foi expresso em mg/g e é mostrado no gráfico a seguir.

Figura 10-Gráfico da diferença da concentração de cafeína entre amostras hidratadas e não hidratadas.



Fonte: Autor 2023.

Foi definido então, realizar uma hidratação prévia das 15 amostras com 5 mL de água ultrapura por 5 min antes de adicionar 20 mL de metanol para extração. Os extratos de erva-mate obtidos através da extração de 90 min assistida por ultrassom são mostrados na figura 9, a grande parte tem coloração verde, porém algumas encontram-se em um tom verde-amarelado, o que pode ser explicado pela forma de processamento da amostra.

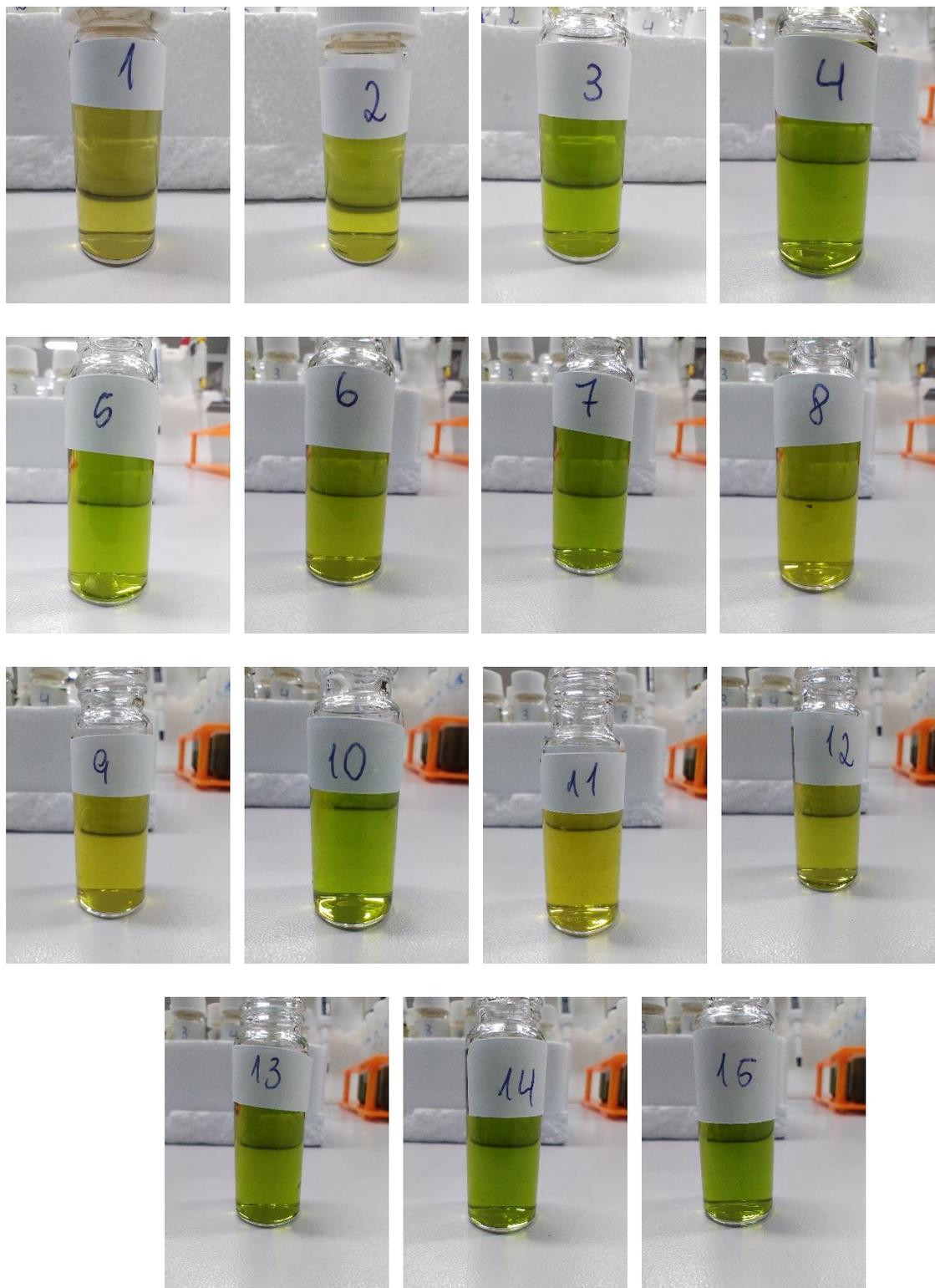
As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando uma solução com todos os padrões na concentração de 2,5 mg/L, a fim de analisar o tempo de retenção dos mesmos com diferentes fase móvel (FM). Foram testadas FMs com solução 0,3 % de ácido fórmico:metanol nas proporções de 40:60, 60:40, 65:35, 70:30, 75:35 e 80:20, respectivamente. A FM que obteve melhor separação dos padrões de cafeína, teobromina e ácido clorogênico foi de 65:35 0,3% ácido fórmico:metanol, e a vazão foi mantida em 0,8 mL/min, visto que uma vazão maior acarretou em um aumento na pressão do sistema.

### 5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Depois de definido todos os parâmetros de extração e condições do equipamento, foi realizada a extração e análise das 15 amostras. Os analitos analisados no HPLC-DAD apresentaram boa separação, com exceção a teobromina, que não foi detectada em 3 amostras e possui um interferente, que ao pesquisar na literatura (PANZL *et al.*, 2022), pode ser um

isômero do ácido clorogênico, visto que o espectro de absorção apresentava absorvância máxima em 325 nm no momento do pico.

Figura 11-Extrato das amostras 1 a 15 de erva-mate.



Fonte: Autor (2023).

Os valores de área dos picos de cada composto analisado foram colocados na equação da reta do seu respectivo composto, e encontrado o valor em mg/L (HPLC-DAD) ou µg/L (UHPLC-MS/MS), que foi convertido a mg/g, e estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 4- Resultados obtidos dos compostos realizados nas amostras de Erva -Mate

	Concentração (mg/g)					
	CAFÉINA		TEOBRMINA		ÁCIDO CLOROGÊNICO	
	HPLC-DAD	UHPLC-MS/MS	HPLC-DAD	UHPLC-MS/MS	HPLC-DAD	UHPLC-MS/MS
<b>1</b>	14,592	14,477	2,015	3,364	2,380	2,140
<b>2</b>	16,674	14,044	2,151	2,692	8,700	4,134
<b>3</b>	5,786	5,902	1,956	3,072	17,485	10,833
<b>4</b>	6,320	5,500	N.D.	N.D.	9,445	6,397
<b>5</b>	11,472	9,692	N.D.	0,656	10,168	5,712
<b>6</b>	4,372	3,851	3,286	3,958	11,986	6,328
<b>7</b>	9,204	6,520	N.D.	N.D.	9,825	4,522
<b>8</b>	14,071	11,712	1,822	2,317	9,973	2,553
<b>9</b>	15,236	9,170	4,167	5,837	8,018	2,662
<b>10</b>	9,303	7,705	0,501	0,994	13,913	3,561
<b>11</b>	15,980	11,348	0,587	1,049	4,358	1,502
<b>12</b>	12,407	17,805	1,691	3,641	3,784	1,495
<b>13</b>	7,404	7,337	8,055	10,885	12,187	4,155
<b>14</b>	4,252	4,022	5,046	6,701	13,207	4,558
<b>15</b>	13,312	12,500	1,739	1,026	7,173	2,220

Fonte: Autor (2023).

Pode-se notar pouca diferença na concentração dos compostos entre a análise dos equipamentos, com exceção de algumas amostras. Nas amostras em que a concentração é mais alta no UHPLC-MS/MS, provavelmente é por conta de que o equipamento é muito mais sensível em relação ao HPLC-DAD, conseguindo quantificar com melhor sensibilidade os analitos, já em relação as amostras em que a concentração é mais alta no HPLC-DAD, pode-se dizer que é devido a diluição, que é muito menor (20x) em relação ao outro equipamento (20000x), que também tem uma separação muito mais efetiva, pois analisa somente os íons remanescentes do composto de interesse, com pouca ou nenhuma interferência.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas curvas analíticas do HPLC-DAD e UHPLC-MS/MS são satisfatórios para quantificação dos compostos analisados, visto que as amostras analisadas se encaixam dentro da faixa de concentração.

A extração de cafeína, teobromina e ácido clorogênico com hidratação prévia das amostras se mostrou satisfatória e apresentou altas concentrações dos compostos comparando com a literatura, que geralmente utiliza infusões aquosas para extração, assim como o tempo de extração assistida por ultrassom, que apresentou os melhores resultados com 90 min.

A quantificação de cafeína em HPLC-DAD apresentou boas separações e picos bem definidos, e resultados muito bons comparados a um equipamento mais sofisticado e moderno como o UHPLC-MS/MS. Foi possível quantificar teobromina e ácido clorogênico, porém ambos possuem alguns interferentes, por isso necessita-se de mais estudos para que se possa analisar com clareza a determinação dos dois compostos em HPLC-DAD, utilizar diferentes vazões e composições de fase móvel pode ser um início para se obter uma melhor separação dos compostos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVEZ, T. L. **Detecção de metabólitos do Ácido Clorogênico e de Metilxantinas em Plasma e urina de indivíduos saudáveis, após a ingestão de Erva-Mate (Ilex paraguariensis, a. St.-hil).** 2016. Dissertação (Mestre em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2016.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**. 2011.
- ARAI, K. et al. Simultaneous Determination of Trigonelline, Caffeine, Chlorogenic Acid and Their Related Compounds in Instant Coffee Samples by HPLC Using an Acidic Mobile Phase Containing Octanesulfonate. **Analytical Sciences**. Vol 31. 2015.
- BASTOS, D. H. M. et al. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2006.
- BELAY, A; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. Vol 3. 2009.
- BENDICHO, C. et al. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**. Vol 31. 2012.
- BHAWANI, S. A; FONG, S. S; IBRAHIM, M. N. M. Spectrophotometric Analysis of Caffeine. **International Journal of Analytical Chemistry**. 2015.
- BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**. 2011.
- BOJIK, M. et al. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil). **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. 2013.
- CARDOZO, A.G.L. et al. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. **Society and Development**. Vol 10. N° 11. 2021.
- CHOUNG, M. et al. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. **International Journal of Food Science and Technology**. 2014.
- CROGE, C. P; CUQUEL, F. L; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Food Science and Technology**. 2020.
- DUGO, P. et al. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. **Journal of Chromatography A**. 2009.
- ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva-mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Food Science and Technology**. 2002.

GAO, G.C. et al. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Catunaregam spinosa*. **Canadian Journal of Chemistry**. 2011.

GAWRON-GZELLA, A; CHANAJ-KACZMAREK, J; CIELECKA-PIONTEK, J. Yerba Mate-A Long but Current History. **Nutrients**. 2021.

GIL, M; WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. **SECTIO AA**. 2017.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 9<sup>a</sup>. ed. – Rio de Janeiro: LTC, 2017.

HECK, C. I; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of food Science**. Vol 72. N° 9. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabelas de pesquisa agrícola mensal**. Sidra - Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em 05 jul. 2023.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**. 2010.

JEONA, J. et al. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. **Journal of Chromatography B**. 2017.

JUARISTI, M.G. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**. 2018.

KALTBACH, P. et al. Mate (*Ilex paraguariensis*) tea preparations: Understanding the extraction of volatile and non-volatile compounds upon variations of the traditional consecutive infusions. **Food Chemistry**. 2022.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. 2<sup>a</sup> ed.- Campinas, SP: Editora Átomo, 2016.

MARIA, C. A. B; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**. Vol 27. N° 4. 2004.

MARQUEZ, V. FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**. 2009.

MATEOS, R. et al. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**. 2018.

MEINHART, A. D. et al. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em 07 jul. 2023

OELLIG, C; SCHUNCK, J; SCHWACK, W. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**. 2017.

PANZL, M.V; MENCHACA, D; HARALAMBIDES, A. R. Analysis of polyphenols and xanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions by high-pressure extraction and ultra-high performance liquid chromatography. **Applied Food Research**. 2022.

PÉREZ-FERNANDES, V. et al. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 2017.

PINTO, R.M.C. et al. Detection and Quantification of Phytochemical Markers of *Ilex Paraguariensis* by Liquid Chromatography. **Química Nova**. Vol 38. N° 9. 2015.

POZEBON, D. et al. Toxic and nutrient elements in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance**. 2015.

RIACH, L.G; MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**. 2017.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Planejamento Governança e Gestão. **Erva-Mate: O Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de folha verde de erva-mate**. Rio Grande do Sul. 2022. Disponível em: <<https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/erva-mate>> Acesso em: 05, Jul 2023.

ROCCA, L. M. *et al.* Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LCMS based methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, p. 766-784, 2017.

RODRIGUES, N.P; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MS<sup>n</sup>. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2013.

SILVA, R. C. et al. Commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) produced in South America: Determination of dithiocarbamate residues by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**. 2022.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

VASCONCELLOS, A. C; FRAZZON, J; NORENÃ, C. P. Z. Phenolic Compounds Present in Yerba Mate Potentially Increase Human Health: A Critical Review. **Plant Foods for Human Nutrition**. 2022.

YÉPEZ, K. A. G; VILELA, J.L; REÁTEGUI, O. Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline by HPLC-DAD in Beverages Commonly Consumed in Lima, Peru. **Hindawi International Journal of Food Science**. 2023.

ZUO, Y; CHEN, H; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**. 2002.