

MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU ADAPTADO PARA QUANTIFICAR POLIFENÓIS EM EXTRATOS DE ERVA-MATE

FOLIN CIOCALTEAU ADAPTED METHOD TO QUANTIFY POLYPHENOLS IN YERBA MATE EXTRACTS

Resumo: A folha de erva-mate é consumida tradicionalmente e conhecida pela alta concentração de polifenóis. O método espectrofotométrico comumente usado para determinar o Teor de Polifenóis Totais (CFT) é o Folin-Ciocalteu. O objetivo desse trabalho foi adaptar o método de Folin-Ciocalteu para determinar o CTF em extrato de erva-mate visando a redução do tempo de reação, proporcionando eficiência e economia. Para tanto, a cinética da reação envolvida na análise do extrato de erva-mate foi estudada, sendo observada uma mudança de inclinação da curva cinética em 30 minutos de reação. Para avaliar a adequação do tempo de reação da análise em 30 minutos, a curva padrão foi obtida por três analistas diferentes e os resultados comparados à análise utilizando tempo de reação de 2 horas, conforme método Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG). Os resultados de absorvância variaram de $0,004 \pm 0,004$ (0 mg EAG L⁻¹) a $1,187 \pm 0,100$ (1000 mg EAG L⁻¹) para a reação de 2 horas. Na reação de 30 minutos estes valores variaram de $0,005 \pm 0,004$ (0 mg EAG L⁻¹) a $1,197 \pm 0,022$ (1000 mg EAG L⁻¹). Estes métodos foram utilizados para quantificar o CFT em folhas de erva-mate e os resultados foram de $58,33 \pm 3,90$ mg EAG g⁻¹ (método tradicional) e de $57,77 \pm 2,70$ mg EAG g⁻¹ (método adaptado). Estes resultados demonstram a reprodutibilidade no método adaptado, mostrando a sua utilidade para obter maior eficiência e economia na análise.

Palavras Chave: polifenóis; *Ilex paraguariensis*; adaptação de metodologia; cinética de reação; planejamento experimental.

Abstrat: Yerba mate leaves are traditionally consumed and known by their high concentration of polyphenols. The spectrophotometric method commonly used to analyze Total Polyphenols Content (CFT) is Folin-Ciocalteu, in which a standard curve of gallic acid is used and the absorbance of samples is analyzed using 765 nm wave-length. The aim of this work was to adapt Folin-Ciocalteu method in order to determinate CFT of yerba mate extract reducing reagents use and reaction time, providing efficiency and economy. Therefore, the kinetics of the reaction was studied and a modification of the inclination of the kinetic curve in 30 minutes reaction time was observed. In order to evaluate the adequacy of the reaction time to 30 minutes, standard curves were obtained by three different analysts and the results were compared to 2 hour reaction time analyses, according to Folin-Ciocalteu method. The results were expressed in gallic acid equivalent (EAG). The absorbance results ranged from 0.004 ± 0.004 (0 mg EAG L⁻¹) to 1.187 ± 0.100 (1000 mg EAG L⁻¹) for the reaction of 2 hours. In the reaction of 30 minute these values ranged from 0.005 ± 0.004 (0 mg EAG L⁻¹) to 1.177 ± 0.022 (1000 mg EAG L⁻¹). These methods were used to quantify the CFT in yerba mate leaves and the results were 58.33 ± 3.90 mg EAG g⁻¹ (traditional method) and 57.77 ± 2.70 mg EAG g⁻¹ (adapted method). These results demonstrate the adapted method reproducibility, showing its usefulness to obtain greater efficiency and economy in the analysis.

Keywords: polyphenols; *Ilex paraguariensis*; method adaptation; reaction kinetics; experimental planning.

Simone Rosa da Silveira Lazzarotto¹
 Marielly Stasyszen de Freitas Scherruth²
 Patricia Sthefani Calixto³
 Matheus de Melo Carraro⁴
 Ana Claudia da Silveira⁵
 Marcelo Lazzarotto⁶

- 1- UEPG, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR (Brasil), Farmacêutica, doutoranda em Ciência e Tecnologia em Alimentos na UEPG, estagiária de pós-graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR;
- 2- FAPAR, Alameda Dom Pedro II, 432, 80420-060, Curitiba, PR (Brasil), graduanda em Nutrição na FAPAR, estagiária de graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR;
- 3- UFPR Av. Professor Lothário Meissner, 632, 80210-170, Curitiba, PR (Brasil), mestranda em Farmácia na UFPR, estagiária de graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR;
- 4- UEPG, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR (Brasil), graduando em Engenharia de Alimentos na UEPG, estagiário de graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR;
- 5- UFPR, Av. Professor Lothário Meissner, 632, 80210-170, Curitiba, PR (Brasil), Farmacêutica, mestre em Farmácia na UFPR, estagiária de pós-graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR;
- 6- Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, km 111, 83411-000, Colombo, PR (Brasil), Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

E-mail: marcelo.lazzarotto@embrapa.br

Recebido em: 11/10/2020

Revisado em: 08/11/2020

Aceito em: 11/12/2020

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma espécie arbórea da família Aquifoliaceae, encontrada em países da América do Sul como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. O consumo de erva-mate é tradicional em diversos países em função dos benefícios que seus bioativos proporcionam à saúde. Dentre os quais se destacamos polifenóis e as metilxantinas com ações antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antidiabética¹. Em um estudo recente foram detectados e identificados um total de 58 polifenóis na erva-mate usando a cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria e a espectrometria de massas associando esta composição ao seu elevado potencial antioxidante².

Polifenóis são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, cuja principal característica é a presença de grupamentos fenólicos. Esses compostos constituem o maior grupo de componentes bioativos encontrados em vegetais e também estão presentes em frutas e hortaliças. Destacam-se os ácidos fenólicos do café, uva e erva-mate^{3,4}. Esses compostos agem como antioxidantes evitando que componentes celulares e tecidos sejam oxidados. Desta forma as atividades físicas associadas ao consumo de alimentos ricos em polifenóis são recomendadas às pessoas que procuram uma melhor qualidade de vida⁵. Além disso, são relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer entre outras^{6,7}.

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) pode ser determinado por estimativa, utilizando métodos espectrofotométricos. No

entanto, também podem ser utilizados métodos cromatográficos e eletroquímicos⁸. O método espectrofotométrico mais tradicional é utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu*, constituído pelos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, nos quais o tungstênio e o molibdênio possuem estado de oxidação 6+, apresentando coloração amarela. Entretanto, em contato com agentes redutores (polifenóis) em pH alcalino, ocorre a formação do molibdênio azul e tungstênio azul, com a média de oxidação entre 5 e 6. Assim, em razão da mudança de coloração é possível determinar a concentração de compostos redutores^{9,10}. Para a análise usando o método de *Folin-Ciocalteu* utiliza-se uma curva padrão de ácido gálico em diferentes concentrações. Deste modo, o teor de polifenóis totais é dado como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. A leitura da curva padrão de ácido gálico, assim como a leitura das amostras é feita no comprimento de onda de 765nm^{9,11}. Este estudo é de grande importância na cultura da erva-mate para determinar esta classe de bioativos inclusive para avaliar o potencial inibitório de germinação das sementes desta espécie florestal¹². Para esta análise é comumente utilizado um método em que são aguardadas duas horas após a adição dos reagentes para serem realizadas as leituras no espectrofotômetro¹³. Até este trabalho não havia sido realizado um estudo de cinética visando a otimização do processo de análise de CFT em extratos de erva-mate.

O objetivo deste estudo foi de aperfeiçoar o método de *Folin-Ciocalteu* para análise de polifenóis totais em extrato de erva-

mate e do tempo de reação, proporcionando eficiência e economia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

As folhas de erva-mate foram coletadas na Embrapa Florestas em Colombo, Paraná, Brasil. A excicata foi depositada no Herbário da Embrapa Florestas, em Colombo-PR, sob a seguinte identificação e número de registro: PGFB (HFC10164). As folhas de erva-mate foram secas em micro-ondas doméstico, segundo o procedimento descrito por Hansel et al.¹⁴, trituradas em liquidificador doméstico e tamisadas utilizando tamises de 18-35 mesh (partículas entre 0,5 e 1,0 mm). Os experimentos foram realizados com este material usando para os cálculos a base seca.

Preparo do extrato de folhas de erva-mate

O extrato foi preparado na concentração de 30 g.L⁻¹ de erva-mate em água aquecida a 85 °C ± 5 °C. A extração ocorreu por 15 min, com agitação mecânica a cada 5 min. O extrato foi previamente filtrado em tamises de 18, 100 e 270 mesh e posteriormente em papel filtro tipo Whatman.

Preparo dos reagentes para análise de Folin-Ciocalteu (Dinâmica®)

Para o preparo da solução estoque do padrão, 50 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich 97,5-102,5% de pureza) foram pesadas em balança analítica e adicionados à um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com álcool etílico 99,5% (grau HPLC). A solução foi homogeneizada e

armazenada em refrigerador revestida com papel alumínio.

A solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) foi preparada usando 20,0 g de Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich ≥ 99,0% de pureza) com 80 mL de água quente (> 80 °C) para dissolução, esperou-se o equilíbrio térmico com o ambiente e então o volume foi corrigido em balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada em refrigerador.

Cinética de reação visando otimização da análise de Folin-Ciocalteu para folhas de erva-mate

O tempo de reação foi determinado através de curvas cinéticas do reagente Folin-Ciocalteu com amostras do extrato de erva-mate. Assim avaliou-se a variação da absorbância ($\lambda = 760$ nm) com relação ao tempo de reação. Foram preparados 40 mL de uma solução contendo 31,6 mL de água, 0,4 mL de extrato de erva-mate, 2 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 6 mL de carbonato de sódio, adicionados respectivamente em um béquer. A solução foi armazenada em local escuro. A cada 5 minutos foi retirada uma alíquota de 1 mL para obtenção da absorbância em espectrofotômetro. Para cada curva foram realizadas 24 leituras em um período de 2 horas. O teste foi realizado em triplicata por analistas diferentes em dias distintos a fim de avaliar sua reprodutibilidade.

Análises de Folin-Ciocalteu para folhas de erva-mate

O preparo das soluções para a leitura no espectrofotômetro foi realizado em tubos de

ensaio, adicionando 1,58 mL de água, 20 µL das soluções da curva (soluções da Tabela 1 com a concentração de uso de ácido gálico), 100 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* e 300 µL da solução de carbonato de sódio, respectivamente. Também foi preparado um tubo substituindo a solução do padrão por água tipo II, de concentração zero. Os tubos foram acondicionados em local escuro por 2 horas, conforme método de referência¹³. Para o método adaptado utilizou-se tempo de reação de 30 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 765 nm. Água tipo II foi utilizada para zerar o equipamento. A curva foi obtida em triplicada, por analistas diferentes em dias distintos, a fim de avaliar a reprodutibilidade do método. As

concentrações de ácido gálico utilizadas para a curva padrão foram de 25 mg.L⁻¹ a 1.000 mg.L⁻¹, obtidas a partir da solução estoque (5.000 mg.L⁻¹), conforme mostra a Tabela 1. Foi analisada a amostra diluída (cinco vezes) usando as equações das retas dos métodos tradicional e adaptado e os valores das concentrações foram calculados por interpolação, multiplicadas pelo fator de diluição e expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por mL de extrato de folhas de erva-mate. Para calcular o CFT nas folhas de erva-mate foi considerada a concentração das mesmas no preparo do extrato (30 g.L⁻¹), ou seja, valor obtido para o extrato multiplicado por 33,33 mL de solução por grama de folhas.

Tabela 1: Diluições realizadas para o preparo da curva padrão de ácido gálico, em que a solução estoque de Concentração A é usada para o preparo da solução de Concentração B.

Tubo	Concentração A da solução estoque de ácido gálico (mg L ⁻¹)	Volume da solução estoque (mL)	Volume de Água (mL)	Concentração B da solução de uso de ácido gálico (mg L ⁻¹)
1	5.000	2,0	8,0	1.000
2	1.000	0,9	0,1	900
3	1.000	0,8	0,2	800
4	1.000	0,7	0,3	700
5	1.000	0,6	0,4	600
6	1.000	1,0	1,0	500
7	1.000	0,4	0,6	400
8	1.000	0,3	0,7	300
9	1.000	0,2	0,8	200
10	1.000	0,1	0,9	100
11	500	0,1	0,9	50
12	500	0,05	0,95	25

RESULTADOS

Curva cinética

Observou-se que os três analistas obtiveram resultados semelhantes nas leituras de absorbância referentes à curva cinética da

reação. Os valores médios nas curvas variaram de $0,144 \pm 0,015$ (tempo 0 minutos) a $0,460 \pm 0,017$ (tempo 120 minutos), Figura 1.

Curva padrão de ácido gálico

Para a curva padrão de ácido gálico utilizando tempo de reação de 2 horas os três analistas obtiveram resultados semelhantes nas leituras de absorvância. Os valores médios nas curvas variaram de $0,004 \pm 0,004$ (Concentração 0 mg L^{-1} de ácido gálico) a $1,187 \pm 0,100$ (Concentração 1000 mg L^{-1} de ácido gálico). Os valores de R^2 destas curvas foram de 0,9918; 0,9945 e 0,9963 para os analistas 1, 2 e 3, respectivamente, Figura 2.

Para a curva padrão de ácido gálico do método adaptado (30 minutos de reação) os três analistas também obtiveram resultados semelhantes nas leituras de absorvância. Os valores médios nas curvas variaram de $0,005 \pm 0,004$ (Concentração 0 mg L^{-1} de ácido gálico) a $1,197 \pm 0,022$ (Concentração 1000 mg L^{-1} de ácido gálico). Os valores de R^2 de 0,9980; 0,9973 e 0,9966 para os analistas 1, 2 e 3, respectivamente, Figura 3.

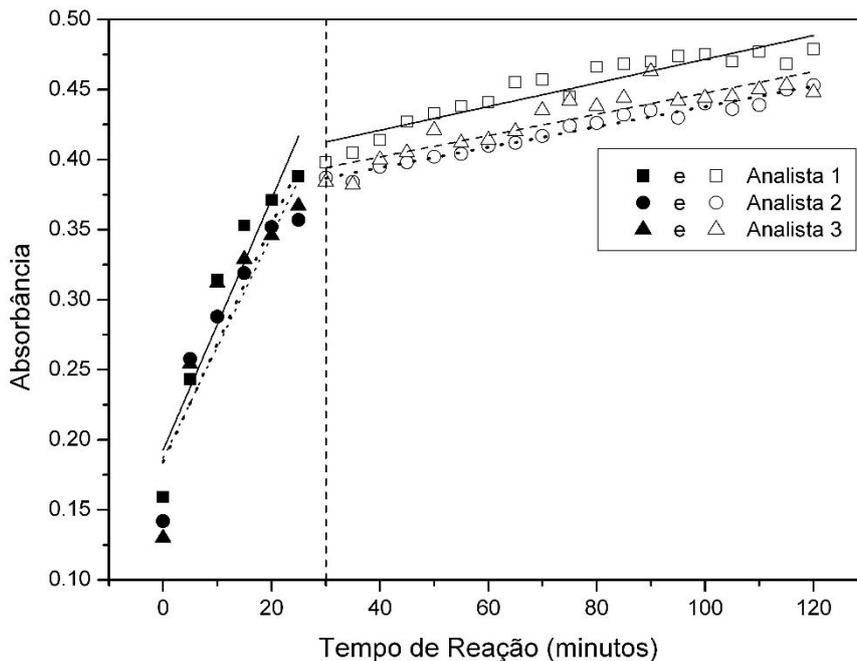
Foi analisado o extrato de folhas de erva-mate usando as equações das retas dos métodos tradicional e adaptado. Os CFT deste extrato foram calculados e os resultados foram de $1,750 \pm 0,117 \text{ mg EAG mL}^{-1}$ (usando o método tradicional) e de $1,733 \pm 0,081 \text{ mg EAG mL}^{-1}$ (usando o método adaptado). Os valores de R^2 foram de 0,9991 (usando o método tradicional) e de 0,9993 (usando o método adaptado). Os valores de CFT nas folhas de erva-mate é de $58,33 \pm 3,90 \text{ mg EAG g}^{-1}$ (método tradicional) e de $57,77 \pm 2,70 \text{ mg EAG g}^{-1}$ (método adaptado).

DISCUSSÃO

Curva cinética

A reação do reagente *Folin-Ciocalteu* com os polifenóis do extrato da erva-mate em meio básico foram muito semelhantes, Figura 1. Foi observado que as curvas obtidas apresentaram repetibilidade (variação entre as medições) e reprodutibilidade (variação do uso da técnica por diferentes analistas) e que os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as análises. Também é observada uma mudança de inclinação da curva a partir de 30 min de reação, permanecendo com um coeficiente angular menor após este período inicial de reação. Os coeficientes de correlação da curva até 30 min variaram de 0,951 a 0,981, com coeficientes angulares entre 0,00793 e 0,00896. Por outro lado, os coeficientes de correlação da segunda parte da curva (após 30 min de reação) variaram de 0,908 a 0,986, com coeficientes angulares entre 0,00073 e 0,00084, ou seja, inclinação aproximadamente 10 vezes menor. Por meio destes resultados sugere-se que o tempo de análise seja reduzido para 30 minutos com resultados confiáveis na determinação de polifenóis presentes no extrato de erva-mate. Esta adaptação da metodologia de determinação de polifenóis em erva-mate permitirá reduzir tempo, e conseqüentemente custos, na rotina laboratorial. Estudos semelhantes foram realizados visando determinar a atividade antioxidante em extratos de erva-mate por Silveira et al.¹⁵.

Figura 1: Curvas cinéticas realizadas por analistas diferentes em dias de análise distintos



Curva padrão de ácido gálico

Os resultados das análises realizadas usando o método de referência (2 horas de reação antes da análise espectrofotométrica) foram adequados e com resultados semelhantes aos já descritos por Dias e Menegon¹⁶. Estes resultados indicam boa precisão da equação da reta, Figura 2. Também foi observada similaridade entre os valores de absorbância obtidos para as análises com

tempo de reação de 30 min. Nestes resultados analíticos também foram observadas boas repetitibilidade e reprodutibilidade usando os métodos de referência e o modificado. As curvas padrão de ácido gálico obtidas utilizando tempo de reação de 30 minutos são apresentadas na Figura 3. Isto mostra que os resultados apresentados neste estudo estão de acordo com dados já existentes na literatura.

Figura 2: Curva padrão de ácido gálico obtida por analistas diferentes em dias de análise distintos utilizando tempo de reação de 2 horas. As retas contínua vermelha, pontilhada azul e tracejada preta são referentes aos melhores ajustes dos experimentos realizados pelos Analistas 1, 2 e 3, respectivamente.

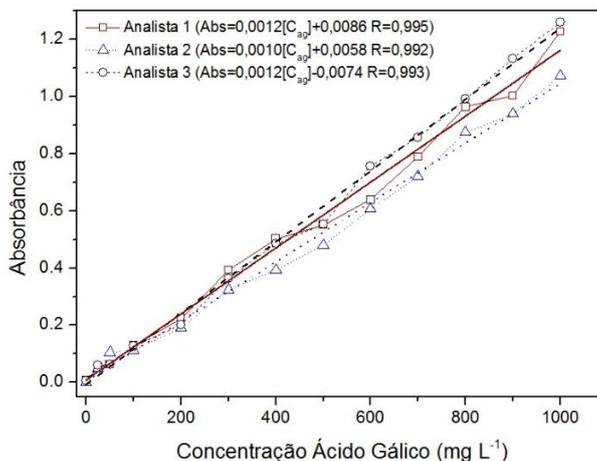
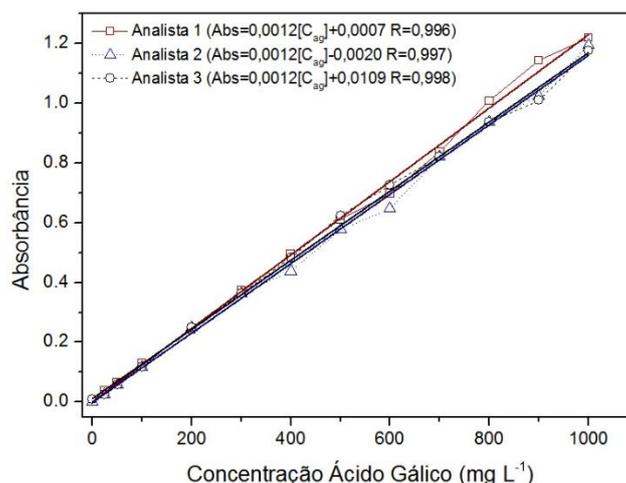


Figura 3: Curva padrão de ácido gálico obtida por analistas diferentes em dias de análise distintos utilizando tempo de reação de 30 minutos. As retas contínua vermelha, pontilhada azul e tracejada preta são referentes aos melhores ajustes dos experimentos realizados pelos Analistas 1, 2 e 3, respectivamente.



Os resultados de CFT do extrato de folhas de erva-mate não apresentaram diferenças significativas entre os métodos tradicional e o adaptado. Considerando a variação genética entre as espécies de erva-mate e a época de colheita, os resultados deste trabalho foram similares ao observado na literatura por Wolf et al. ($1,671 \pm 0,101$ mg EAG mL⁻¹)¹⁷. Comparando os valores de CFT nas folhas deste trabalho com os obtidos por Duarte et al. para 12 genótipos (53,18 a 111,27 mg EAG g⁻¹) também é observada a similaridade entre os resultados¹⁸.

CONCLUSÃO

O método adaptado para análise de polifenóis de extratos das folhas da erva-mate utilizando reagente de *Folin-Ciocalteu* apresentou reprodutibilidade. Além disso, o tempo de reação entre o padrão de ácido gálico ou a amostra do extrato de erva-mate e o reagente de *Folin-Ciocalteu* pode ser reduzido em 75% comparado ao tempo de análise comumente utilizado (2 horas), sem que a confiabilidade dos resultados seja alterada.

REFERÊNCIAS

1. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*.2013;18:1818–1892.
2. Mateos R, Baeza G, Sarriá B, Bravo L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxantines, and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2018;241:232-241.
3. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(1):215S-217.
4. Faller ALK, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Revista de Saúde Pública*.2009;43(2):211-218.
5. Furlan A, Rodrigues L. Consumo de polifenóis e sua associação com conhecimento nutricional e atividade física. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*.2016;22(6):461-464.
6. Ramirez-Mares MV, Chandra S, Gonzalez de Mejia E. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extract and selected polyphenols. *Mutation Research*.2004;554:53-65.
7. Chandra S, Gonzalezde Mejia E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2004;52:3583-3589.

8. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*.2007;66(1):1-9.
9. Andreo D, Jorge N. Capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa de *Gengiber officinale*. *Journal of Health Sciences*. 2011;13(1):33-37.
10. Sousa CMM, Silva HR, Junior GMV, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*.2007;30(2).
11. Almeida JRGS, Araújo CS, Ó Pessoa C, Costa MP, Pacheco AGM. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annonavepretorum* Mart. (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2014;36:258-264.
12. Mireski MC, Bühner CB, Helm CV, Wendling I, Vieira ESN, Santos ÁF, Nogueira AC. Polyphenols in yerba mate seeds: potential inhibitors of germination. *Floresta*.2018;48(4):593-600.
13. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*.1999;299:152-178.
14. Hansel FA, Domingos DM, de Lima KMG, Pasquini C. Moagem e Sapeco/Secagem em forno de Microondas na Classificação Sensorial de Erva-Mate no Infravermelho Próximo. Colombo: Embrapa Florestas. 2008; 203:8.
15. Silveira AC, Kassuia YS, Domahovski RC, Lazzarotto M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. Colombo: Embrapa Florestas. 2018; 421:11.
16. Dias SP, Menegon RF. Comparação do teor de fenólicos totais e da ação antioxidante de sucos industrializados e de vinhos tinto. *Revista Univap*.2012;18:32.
17. Wolff SM, Silveira AC, Lazzarotto M. Metodologia para Extração de Fenólicos Totais e Antioxidantes da Erva-Mate. *ICCESumar*. 2019; 21:45-54. DOI: 10.17765/1518-1243.2019v21n1p45-54
18. Duarte MM, Tomasi JC, Helm CV, Amano E, Lazzarotto M, Godoy RCB, Nogueira AC, Wendling I. Caffeinated and decaffeinated mate tea: Effect of toasting on bioactive compounds and consumer acceptance. *Food Science*. 2020; 15:e8513. DOI: 10.5039/agraria.v15i3a8513