

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RODRIGO MOREIRA CAETANO PINTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA A AVALIAÇÃO QUALITATIVA,
QUANTITATIVA E QUIMIOMÉTRICA DE EXTRATOS DE *Ilex paraguariensis***

PONTA GROSSA

2014.

RODRIGO MOREIRA CAETANO PINTO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA A AVALIAÇÃO QUALITATIVA,
QUANTITATIVA E QUIMIOMÉTRICA DE EXTRATOS DE *Ilex paraguariensis***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, Universidade Estadual de Ponta Grossa-PR, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste-PR.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.

Co-Orientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira.

PONTA GROSSA

2014.

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

P659 Pinto, Rodrigo Moreira Caetano
Desenvolvimento e validação de um método por cromatografia líquida para a avaliação qualitativa, quantitativa e quimiométrica de extratos de *Ilex paraguariensis*/ Rodrigo Moreira Caetano Pinto. Ponta Grossa, 2014.

82 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.
Coorientador: Prof. Dr. Airton Vicente Pereira.

1.*Ilex paraguariensis*. 2.Quimiometria. 3.CLAÉ. 4.Fingerprint. 5.Quality by design. I.Beltrame, Flávio Luís. II. Pereira, Airton Vicente. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual Centro - Oeste -PR. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 544.92

TERMO DE APROVAÇÃO

RODRIGO MOREIRA CAETANO PINTO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA A AVALIAÇÃO QUALITATIVA, QUANTITATIVA E QUIMIOMÉTRICA DE EXTRATOS DE *Ilex paraguariensis*

Dissertação aprovada em 24/02/2014 como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da área de concentração Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela banca examinadora:

Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame (orientador)
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Prof^a. Dra. Quezia Bezerra Cass
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de 2014.

*Dedico este trabalho a Deus, único
Senhor da minha vida, que me concedeu
força, garra e os dons necessários à
conquista dos meus maiores sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com o dom da inteligência e me dar saúde e condições de realizar esse sonho.

Aos meus pais, que sempre deram todo o suporte para que eu concretizasse todas as minhas metas.

Aos demais familiares, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas e empreitadas, e nutrirem admiração pela pessoa que sou e pelo trabalho que desempenho.

À minha noiva, Izacelis, por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e dificuldades, e por compreender minhas ausências e superar comigo os maiores desafios.

Aos meus sogros e cunhados, nova família que recebi e me acolheu, participando de forma importante no apoio e na oração.

Aos meus amigos pessoais, por me permitirem compartilhar as vivências e dificuldades decorrentes deste período.

Ao Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, a quem tanto admiro, por ter aberto as portas para que eu ingressasse na pesquisa desde a iniciação científica, mantendo a parceria na orientação do mestrado. Obrigado pela paciência, por compartilhar comigo seus conhecimentos, por me oportunizar novos e grandes desafios, por ter acreditado na minha capacidade e ter exigido sempre o meu melhor. Também à sua esposa, Zilda, pelas contribuições nas correções metodológicas e por ser sempre tão gentil.

Ao Prof. Dr. Airton Vicente Pereira, pela co-orientação.

Ao Acácio e ao Prof. Dr. Airton Kist, pelo auxílio nas análises quimiométricas.

Ao Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate e ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira, por terem gentilmente cedido o cromatógrafo.

Aos funcionários da Waters do Brasil, pelo apoio na realização da otimização.

À Prof^a. Dra. Quezia Bezerra Cass e ao Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate, por terem aceitado o convite de participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Produção de Medicamentos da UEPG (LAPMED), especialmente às farmacêuticas Lívia e Traudi, pelo auxílio nos primeiros passos da parte experimental.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por terem se empenhado em levar os mestrandos ao crescimento intelectual, aprofundamento científico e desenvolvimento de senso crítico.

Aos meus colegas mestrandos, especialmente Luiz, Jaqueline e Marissa, pela amizade e parceria durante o curso de pós-graduação.

Às alunas de iniciação científica, hoje farmacêuticas Fernanda e Bruna, pela colaboração.

À Prof^a. Dra. Vanessa Torres, por ter aberto as portas ao meu ingresso como docente em uma instituição de ensino superior, possibilitando meu desenvolvimento na área acadêmica.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Pinheiro, pelo brilhante curso ministrado e disponibilidade para sanar as dúvidas a respeito do planejamento fatorial.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por possibilitar a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

ABREVIações E Símbolos

AAH	Análise de agrupamento hierárquico
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de componentes principais
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CPP	Cromatografia planar preparativa
DOE	<i>Design of experiments</i>
DS	<i>Design space</i>
EM	Espectrometria de massas
EMA	<i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FN	Fase normal
FR	Fase reversa
ICH	<i>International Conference of Harmonisation</i>
IV	Infravermelho
k	Fator de retenção
LID	Limite inferior de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
MeOH	Metanol
MTBE	Éter metil-terc-butilico
MTC	Medicina tradicional chinesa
N	Número de pratos teóricos
p/v	Peso/volume
PCP	Parâmetros críticos do processo

QbD	<i>Quality by Design</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
R_s	Resolução
THF	Tetra-hidrofurano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
α	Fator de separação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplo de matriz de planejamento fatorial 2 ² .	24
Tabela 2 – Fatores avaliados na fase da varredura do desenho experimental.	37
Tabela 3 – Fatores avaliados na fase de otimização do desenho experimental.	38
Tabela 4 – Quantificação de polifenólicos e flavonoides totais nos extratos de erva-mate pelo método de Folin-Ciocalteu.	47
Tabela 5 – Condição cromatográfica obtida pelo estudo fatorial nas plataformas CLUE e CLAE.	53
Tabela 6 – Parâmetros de validação da teobromina, ácido clorogênico e cafeína.	59
Tabela 7 – Resultados da quantificação de teobromina, ácido clorogênico e cafeína nas amostras comerciais.	65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fatores controláveis e não controláveis na otimização cromatográfica.	24
Figura 2 – Interpretação gráfica de um modelo fatorial 2^2 com ponto central e pontos axiais	25
Figura 3 – Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.).	30
Quadro 1 – Origem das amostras de erva-mate analisadas.	35
Figura 4 – Magnitude dos coeficientes da primeira equação de regressão.	50
Figura 5 – Cromatograma obtido por CLUE após a primeira etapa da otimização.	50
Figura 6 – Magnitude dos coeficientes da segunda equação de regressão.	51
Figura 7 – Superfície de resposta envolvendo fluxo/concentração final de metanol versus número de picos com $R_s > 1,5$.	52
Figura 8 – <i>Fingerprint</i> de erva-mate obtido por CLUE após a otimização do método.	54
Figura 9 – <i>Fingerprint</i> de erva-mate obtido por CLAE.	54
Figura 10 – Marcadores químicos selecionados para a quantificação na erva-mate.	56
Figura 11 – Curva de calibração da cafeína	57
Figura 12 – Curva de calibração da teobromina.	57
Figura 13 – Curva de calibração do ácido clorogênico	58
Figura 14 – Cromatograma dos padrões primários de 1) teobromina; 2) ácido clorogênico; 3) cafeína.	58
Figura 15 – Análise de resíduos da curva analítica da cafeína.	61
Figura 16 – Análise de resíduos da curva analítica da teobromina.	62
Figura 17 – Análise de resíduos da curva analítica do ácido clorogênico.	63
Figura 18 – Curva de adição de padrão da cafeína.	64
Figura 19 – Curva de adição de padrão da teobromina.	64
Figura 20 – Curva de adição de padrão do ácido clorogênico.	65
Figura 21 - <i>Fingerprints</i> obtidos dos extratos hidroalcoólicos (H) de erva-mate.	67
Figura 22 – <i>Fingerprints</i> obtidos dos extratos aquosos (A) de erva-mate.	68

Figura 23 – ACP dos <i>fingerprints</i> dos extratos hidroalcoólicos (H) de erva-	69
mate.	
Figura 24 – ACP dos <i>fingerprints</i> dos extratos aquosos (A) de erva-mate.	69
Figura 25 – AAH dos <i>fingerprints</i> dos extratos hidroalcoólicos de erva-mate	70
Figura 26 – AAH dos <i>fingerprints</i> dos extratos aquosos de erva-mate.	71
Figura 27 – ACP dos <i>fingerprints</i> dos extratos aquosos (A) e hidroalcoólicos	72
(H) de erva-mate.	
Figura 28 – AAH dos <i>fingerprints</i> dos extratos aquosos (A) e hidroalcoólicos	72
(H) de erva-mate.	

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA A AVALIAÇÃO QUALITATIVA, QUANTITATIVA E QUIMIOMÉTRICA DE EXTRATOS DE *Ilex paraguariensis*

A utilização de produtos naturais com fins terapêuticos ou nutracêuticos é crescente na sociedade brasileira devido à facilidade de acesso a estes. Entretanto o uso indiscriminado ou sem uma correta identificação da espécie vegetal que se está utilizando pode se apresentar como um risco ao usuário. Desta forma estudos fitoquímicos, farmacológicos e principalmente o desenvolvimento de métodos analíticos de controle da qualidade destes produtos e seus extratos se constituem em ações importantes para se garantir a confiabilidade dos mesmos. Desta forma, é necessário que a avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais seja consistente e respalde sua identidade e qualidade. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. - Aquifoliaceae) é uma espécie vegetal nativa do sul do Brasil, muito consumida como bebida estimulante e vem se apresentando como uma matéria prima de grande valor econômico devido ao crescente interesse das indústrias de medicamentos, cosméticos e alimentos em decorrência principalmente do seu potencial antioxidante, estimulante e lipolítico. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método rápido e eficiente para a avaliação qualitativa e quantitativa de plantas medicinais e seus extratos e o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação da sua qualidade se constitui em uma ação necessária a ser empregada no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Para as indústrias, a abordagem *Quality by Design* – que propõe a criação de um desenho experimental que avalia simultaneamente múltiplos fatores relevantes para a eficiência da separação – se constitui em uma alternativa de estudo à otimização clássica de métodos por CLAE, pois permite que mais variáveis sejam avaliadas em um menor tempo e com maior eficiência. Desta forma, foi objetivo deste trabalho realizar um estudo fatorial das principais variáveis que podem interferir na otimização de um método cromatográfico para extratos vegetais e assim propor o desenvolvimento de um método analítico. Num primeiro momento, foram avaliadas a fase estacionária, faixa de pH, tipo de modificador orgânico e o tempo de corrida. Numa segunda etapa, foram avaliados o valor exato de pH, a concentração final do modificador orgânico, a temperatura e o fluxo. O método desenvolvido foi utilizado para avaliação das características químicas de sete amostras comerciais de erva mate obtidas no comércio da cidade de Ponta Grossa. O cromatograma *fingerprint* foi utilizado para a realização de um estudo quimiométrico que permitiu classificar as amostras quanto a semelhanças e diferenças químicas decorrentes da região de plantio, procedimento de processamento empregado e solvente extrator usado. Ainda, a corrida cromatográfica obtida possibilitou avaliação quantitativa de três marcadores químicos (ácido clorogênico, cafeína e teobromina). Os teores dos marcadores encontrados nas amostras avaliadas, através do método cromatográfico validado variaram entre as amostras de extrato aquoso (A) e hidroalcoólico (H), devido à diferença de potencial extrativo entre esses solventes/procedimentos. O maior teor de cafeína foi encontrado na amostra 5 (92, 7 mg/100 g de folhas secas (A) e 349,19 mg/100g (H)). A mesma amostra apresentou o menor teor de teobromina no extrato hidroalcoólico (45,88 mg/100g), provavelmente porque as duas xantinas dividem a mesma rota de biossíntese. O ácido clorogênico foi encontrado em maior proporção na amostra 2 (388,15 mg/100g (H) e 110,42 mg/100g (A)). Os achados deste estudo reforçam o uso da cromatografia líquida, como um método analítico que associado a ferramentas estatísticas possibilitam incrementar as estratégias de controle de qualidade da erva-mate enquanto matéria-prima vegetal.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, CLAE, quimiometria, *fingerprint*, *Quality by Design*.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE QUALITATIVE, QUANTITATIVE AND CHEMOMETRIC EVALUATION OF *Ilex paraguariensis* EXTRACTS

The use of natural products with therapeutic or nutraceutical purposes is growing in the Brazilian society, due to the easy access to this. However, the indiscriminate use or use of wrongly identified species represent a risk to the user. Thus, phytochemical and pharmacological studies, and the development of analytical methods to the quality control of these products are important actions to ensure the reliability of them. Thus, it is necessary a consistent quality evaluation of vegetal raw materials, that endorse its identity and quality. The *erva-mate* (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. - Aquifoliaceae) is a South Brazilian native species, heavily consumed as stimulant drink. This plant has presented a great economic value as raw material, due to the growing interest of the cosmetic and pharmaceutical industries, mainly arising from the stimulant, antioxidant and lipolytic potential. The high performance liquid chromatography (HPLC) is a fast and efficient method to the qualitative and quantitative evaluation of medicinal plants and its extracts. The development of analytical methods to quality control of these materials is a necessary action for the pharmaceutical, cosmetic and food industries. To the industries, the Quality by Design approach – that proposes the creation of a design of experiments (DOE) that evaluate simultaneously many relevant factors to the separation efficiency – is an alternative to the classic optimization of HPLC methods, because it allows the efficient evaluation of more variables in a short time. In this sense, the aim of this work was to realize a factorial study (QbD-DOE) of the main variables that may affect the optimization of a chromatographic method to vegetal extracts, and proposes the development of an analytical method. Were analyzed many relevant factors to the resolution of the chromatographic bands. In a first step, were evaluated the stationary phase, pH range, organic modifier type and the gradient time. In a second stage, was evaluated the pH value, final % of organic modifier, temperature and flow rate. The developed method was used to the evaluation of chemical characteristics of seven commercial samples of *erva-mate* obtained in the market of Ponta Grossa. The fingerprint was employed in a chemometric study, that allowed to classify the samples according to the chemical profiles, arising from plantation place, processing and extractor solvent. Yet, the obtained chromatographic run enabled the quantitative analysis of three chemical markers (chlorogenic acid, caffeine and theobromine). The contents of the markers founded by the validated method in the evaluated samples were different between aqueous (A) and hydroethanolic (H) extracts, due to the differences on extraction potential of these solvents/procedures. The biggest content of caffeine were founded in the sample 5 (92.7 mg/100 g of dry leaves (A) and 349.19 mg/100g (H)). The same sample presented the least content of theobromine, in hydroethanolic extract (45.88 mg/100g), probably because the both xanthines are sourced from the same biosynthetic route. The chlorogenic acid were founded in highest proportion in the sample 2 (388.15 mg/100g (H) and 110.42 mg/100g (H)). The findings of this study reinforce the use of liquid chromatography as an analytical method, that associated to statistical tools may increase the strategies of *erva-mate* quality control, as vegetal raw material. Keywords: *Ilex paraguariensis*, HPLC, chemometrics, chemometrics, Quality by Design.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	20
2.2 Quimiometria	23
2.2.1 Otimização cromatográfica e planejamento fatorial de experimentos	23
2.2.2 Análise exploratória de dados cromatográficos	28
2.3 Erva-mate	29
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Material vegetal	35
4.2 Reagentes	35
4.3 Preparo dos extratos.....	36
4.4 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico.....	36
4.4.1 Instrumentação e colunas cromatográficas	36
4.4.2 Otimização das condições cromatográficas	37
4.5 Validação e aplicação do método nas amostras comerciais.....	40
4.5.1 Preparo dos padrões.....	40
4.5.2 Preparo das amostras.....	40
4.5.3 Curva de calibração.....	40
4.5.4 Curva de adição de padrão	41
4.5.5 Recuperação, precisão intermediária e precisão	41
4.5.6 Seletividade	42
4.5.7 Limites inferiores de detecção (LID) e de quantificação (LIQ).....	42
4.5.8 Quantificação de cafeína, teobromina e ácido clorogênico nas amostras comerciais	42

4.6 Quantificação de polifenólicos totais por espectrofotometria	42
4.6.1 Determinação da curva de calibração.....	42
4.6.2 Determinação de polifenólicos totais nas amostras.....	43
4.7 Quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria.....	43
4.7.1 Determinação da curva de calibração.....	43
4.7.2 Determinação de flavonoides totais nas amostras.....	43
4.8 Quimiometria	44
4.8.1 Alinhamento de bandas	44
4.8.2 Análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Quantificação de polifenólicos totais e flavonoides totais.....	46
5.2 Otimização do método cromatográfico	48
5.3 Validação e análise quantitativa.....	55
5.4 Quimiometria	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso de plantas medicinais e/ou fitoterápicos como recurso terapêutico para o tratamento de distúrbios menores tem sido expressivo, devido, principalmente, ao baixo custo, fácil acesso desses produtos pela população e divulgação publicitária na mídia (MACHADO, 2007; COUTINHO, 2009).

Substâncias bioativas estão presentes em diversas matrizes vegetais (entre alimentos funcionais e plantas medicinais), envolvendo caules, folhas, raízes, flores, entre outros. Sua importância não reside somente no consumo dos mesmos *in natura*, mas também na obtenção de extratos e no isolamento de substâncias potencialmente úteis em formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, mercado no qual a indústria tem investido muito (PEREIRA, 2012).

Esta última afirmativa se torna mais relevante quando se observam estimativas atuais que demonstram que 44% do arsenal terapêutico mundial é originado a partir de produtos naturais (SIANI; MICHILES, 2005; BRAZ-FILHO, 2010; TREVISAN, 2010).

Contudo, para que se garantam a efetividade e segurança desses produtos, é importante que sejam realizadas rotinas consistentes de avaliação da sua qualidade, pois as plantas medicinais e os produtos oriundos destas (extratos ou medicamentos fitoterápicos/nutracêuticos) podem apresentar uma grande variabilidade química. Fatores como a região de cultivo, alterações da temperatura, umidade relativa, tempo de exposição ao sol, regime de ventos e tipo de solo podem influenciar a produção das substâncias bioativas de interesse, assim como a variabilidade genética, que envolve situações em que plantas da mesma espécie podem diferir consideravelmente em sua composição química devido à polinização cruzada de plantas silvestres (YARIWAKE et al. 2005; ROSSATO et al., 2006).

Para a avaliação química (qualitativa ou quantitativa) dos constituintes do metabolismo secundário dos vegetais podem ser empregadas metodologias como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna (CC), cromatografia planar preparativa (CPP), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que podem ser associadas a técnicas espectrais, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) para elevar sua eficiência analítica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Quando, além deste estudo químico, agregam-se modelos biológicos na avaliação da qualidade (eficácia terapêutica) destes produtos, possibilita-se o incremento das informações científicas sobre estes materiais.

Dentre as técnicas químicas comumente empregadas para a avaliação de plantas medicinais, destaca-se a CLAE, que permite a obtenção de cromatogramas *fingerprint*, dados que exploram adequadamente a complexidade dos extratos vegetais. Os inúmeros dados obtidos a partir destes cromatogramas podem ser analisados através do uso de técnicas quimiométricas, que permitem a classificação de amostras de acordo com suas semelhanças ou diferenças e, ainda, determinar propriedades de interesse.

Estas metodologias são empregadas para o controle de qualidade de drogas vegetais por instituições como o *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) (LIANG; XIE; CHAN, 2004). Vários estudos já foram realizados e comprovam a utilidade da técnica nesta forma de avaliação (BELTRAME et al., 2006; CHEN et al., 2008; PENG et al., 2011; PAN et al., 2011; MARTINS; PEREIRA-FILHO; CASS, 2011).

Por outro lado, destaca-se a importância de determinar marcadores quimiotaxonômicos nas espécies vegetais, a fim de corroborar a avaliação qualitativa. Estes marcadores tratam-se de pequenas moléculas que representam o ritmo metabólico de determinada espécie, que interfere quantitativamente e qualitativamente na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO et al., 2005). Os metabólitos secundários são os principais responsáveis pela atividade biológica, de forma que a determinação quantitativa dos mesmos torna-se um parâmetro de qualidade diretamente relacionado à eficácia de determinado extrato vegetal (ALVARENGA et al., 2009).

Dentro deste contexto a erva-mate é uma espécie vegetal característica do sul do Brasil, descrita botanicamente por Auguste Saint Hilaire em 1822, denominada cientificamente como *Ilex paraguariensis* e pertencente à família Aquifoliaceae (FORZZA, 2010).

Trata-se de uma árvore cujo caule pode chegar a 50 cm de diâmetro, com ramos cilíndricos ou semicilíndricos, atingindo usualmente de 2 a 7 metros de altura. Possui folhas subcoriáceas até coriáceas de pecíolo curto e tamanho médio de 8 a 10 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura (CANSIAN, 2003).

A erva-mate é muito consumida no sul do Brasil na forma bebida quente conhecida por “chimarrão”, uma bebida fria chamada “tererê”, ou mesmo sob a forma de chá. Além do consumo popular como bebida estimulante, as indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas têm se interessado nas propriedades bioativas de compostos presentes nesta espécie.

Caracteriza-se quimicamente pela presença de metabólitos secundários como as saponinas, polifenóis e metilxantinas, sendo os mais abundantes os ácidos fenólicos (GNOATTO et al., 2007; MATSUMOTO, 2008; ISOLABELLA et al., 2010). Estes componentes são responsáveis pelas atividades estimulante e antioxidante, há muito tempo

reconhecidas e exploradas (GNOATTO et al., 2007; MATSUMOTO, 2008). Além dessas, vem sendo estudadas a atividade citotóxica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabética, anti-obesidade (MATSUMOTO, 2008; WNUK et al., 2009; ARÇARI et al., 2011; BURRIS et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2012; KANG et al., 2012), além dos efeitos no aprendizado e memória (PREDIGER et al., 2008) e as propriedades das saponinas em aplicações tecnológicas (CANTO, 2007).

Levando em consideração as informações apresentadas, respalda-se a importância da avaliação coerente da qualidade de plantas medicinais, no intuito de assegurar a eficácia de fitoterápicos ou demais produtos preparados a partir de matérias-primas vegetais. A diversidade de metodologias disponíveis com o avanço tecnológico possibilita o desenvolvimento de métodos para a avaliação rápida, eficiente e viável na prática dos laboratórios de controle de qualidade. Justifica-se tal estudo envolvendo a erva-mate devido ao seu potencial terapêutico e promissora utilidade na área farmacêutica, alimentícia e cosmética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A partir da década de 80, a CLAE passou a se popularizar, o que refletiu no aumento de publicações científicas envolvendo o emprego da técnica. Em 1983, Verpoorte e colaboradores publicaram um estudo demonstrando a eficiência de separação de alcaloides quinolínicos provenientes do gênero *Cinchona* através da CLAE, comparativamente a técnicas mais simples, como a cromatografia em camada delgada (CCD). Os autores empregaram fase normal e não conseguiram a separação completa de todos os oito alcaloides de interesse, mas demonstraram as vantagens do método em relação à CCD.

Lin e Xu (1984) realizaram ensaios cromatográficos para a separação de oito sapogeninas esteroidais utilizadas para a produção de importantes fármacos esteroides. Os autores cromatografaram as amostras em fase normal e reversa e observaram que ambas as condições foram capazes de promover a separação adequada das substâncias. O estudo concluiu também que os grupos químicos foram fatores relevantes na polaridade das moléculas sendo, portanto, determinantes da retenção das mesmas no sistema cromatográfico.

No contexto mais recente, inúmeras fases estacionárias e sistemas cromatográficos estão disponíveis, oferecendo grande versatilidade no desenvolvimento dos métodos de análise, permitindo a aplicação da CLAE em várias áreas da ciência. Wang e colaboradores (2011) desenvolveram e validaram um método cromatográfico para a detecção e quantificação de fármacos residuais em águas naturais e tratadas do estado de Missouri (EUA). Através da detecção por espectrometria de massas, foi possível avaliar simultaneamente 16 fármacos e validar o método. Os autores concluíram que, com exceção da cafeína, todas as demais substâncias, quando presentes, estavam em baixíssimas concentrações.

Wu e colaboradores (2012) utilizaram CLAE para determinar a farmacocinética da catequina e epicatequina, importantes monômeros de flavonoides, ocorrentes abundantemente em produtos naturais. Os autores utilizaram um cromatógrafo acoplado a um detector de quimioluminescência e puderam determinar quantitativamente os fármacos após liberação cerebral *in vivo*. Parâmetros farmacocinéticos como a área sob a curva (ASC) foram calculados e os resultados permitiram reforçar os indícios do efeito neuroprotetor associado a essas substâncias.

Em outro aspecto, Xu e colaboradores (2012) utilizaram CLAE acoplado a espectrometria de massas para detectar espécies de DNA triplex (um tipo de ácido nucleico

estruturado em tripla hélice) em amostras complexas. Os autores ressaltam que embora existam outras técnicas eficientes na detecção do produto, a CLAE apresenta-se como uma poderosa ferramenta quando se tratam de amostras desconhecidas e de elevada complexidade.

Os chamados cromatogramas *fingerprint* são como impressões digitais das espécies vegetais, isto é, representam um perfil químico de toda a composição detectável no extrato bruto, consistindo numa análise mais completa do que a pesquisa e/ou quantificação de alguns marcadores químicos (XU et al., 2006).

Um *fingerprint* pode ser obtido a partir de diversas técnicas analíticas, desde os métodos de separação, como a cromatografia, até as metodologias hífenadas, que envolvem a associação destes citados com técnicas espectrais, como por exemplo, a espectrometria de massas. O objetivo da análise, neste caso, não é identificar cada composto detectado, mas comparar diferentes perfis metabólicos em função de determinada resposta (CABRAL, 2010).

Esses dados fornecem informações importantes ao controle de qualidade de plantas medicinais e têm sido úteis na autenticação das mesmas. Essas análises foram introduzidas pela Organização Mundial de Saúde e vem sendo recomendadas por órgãos regulatórios internacionais como o *Food and Drug Administration* (FDA) e o *European Agency for the Evaluation of the Medicinal Products* (EMA) (ALAERTS et al., 2007)

Pellati, Orlandini e Benvenuti (2012) utilizaram CLAE e dois tipos de detectores – arranjo de diodos e espectrômetro de massas – para a obtenção do *fingerprint* metabólico e avaliação simultânea dos compostos polares e apolares de *Echinacea pallida*. O estudo demonstra a detecção e quantificação do ácido cafeico e derivados, além de polienos e poliacetilenos. O método foi validado e passou a representar uma estratégia para a padronização e controle da qualidade de extratos contendo *E. pallida*.

No mesmo sentido, Li e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram um método cromatográfico para a avaliação combinada do *fingerprint* e análise quantitativa de nove marcadores químicos para o controle de qualidade de um produto chamado *Yqing* (uma mistura de extratos vegetais). Trata-se do primeiro estudo relatando ensaios que demonstram diferenças no produto obtido de diferentes fabricantes. Os autores concluem que o *fingerprint* é uma poderosa ferramenta de comparação, enquanto que a avaliação quantitativa eleva a consistência da avaliação da qualidade, por levar em consideração marcadores das diversas espécies presentes na composição do produto.

Posteriormente, Yang e colaboradores (2011) também validaram um método combinado para a avaliação quantitativa e dos *fingerprints* de um produto típico da medicina tradicional chinesa (MTC), chamado *Shuang-Huang-lian* (SHL). No *fingerprint*, 45 picos foram

selecionados como as bandas comuns para avaliar a similaridade entre as amostras obtidas de diferentes fabricantes. Onze metabólitos foram quantificados, como o ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e outros polifenólicos. Os autores apresentam no estudo o primeiro método do gênero para a avaliação da qualidade de formulações orais do SHL e concluíram que se trata de um método que fornece grande quantidade de informações, ao passo que é simples e rápido.

Ding e colaboradores (2011) desenvolveram um método simples e rápido para a obtenção de *fingerprints*, no objetivo de caracterizar preparações medicinais a base de cascas e ramos de canela, originária de três diferentes países (China, Vietnã e Indonésia). Ao mesmo tempo, foram quantificados os sete principais metabólitos relacionados à atividade biológica atribuída à espécie. Os autores observaram diferença significativa no teor de ácido cinâmico entre os órgãos do vegetal e salientam que este dado quantitativo é útil para verificar o enquadramento das amostras no que regulamenta a legislação, mas não é suficiente para discriminar as amostras. Entretanto, através da comparação da similaridade entre os cromatogramas de cada amostra, obtiveram-se dois grupos distintos, um correspondendo à casca e o outro aos ramos de canela, sugerindo que há variação na composição química entre eles.

Ainda tratando do controle de qualidade, Arceusz e Mesolowski (2013) compararam os *fingerprints* de diferentes amostras comerciais de *Melissa officinalis*, além de quantificar os marcadores químicos mais relevantes para a atividade farmacológica, concluindo também a eficiência do método no monitoramento da qualidade do produto analisado.

Outra abordagem para o qual o cromatograma *fingerprint* se destaca está no trabalho de Wang, Wang e Kong (2012), que desenvolveram um trabalho neste sentido no intuito de criar um padrão de reconhecimento para diferenciar duas espécies *Epimedium wushanense* e *Epimedium koreanum*. O método foi capaz de diferenciar as espécies e classificar as amostras de cada uma em grupos distintos, e os autores concluem que esta estratégia é potencialmente útil para a determinação da autenticidade de plantas medicinais.

Marrassini, Anesini e Ferraro (2011) obtiveram o *fingerprint* de *Tilia x viridis* através de CLAE para a determinação do perfil fitoquímico, somado à quantificação de polifenólicos totais por espectrofotometria. Estes ensaios participaram do biomonitoramento das atividades antioxidante e antiproliferativas estudadas na espécie. Os autores concluíram que os compostos polifenólicos detectados na CLAE-DAD e na espectrofotometria foram os responsáveis pela atividade antioxidante mensurada e relatada pela primeira vez na espécie. A atividade antioxidante, por sua vez, está envolvida no mecanismo antiproliferativo contra células de linfoma.

2.2 Quimiometria

2.2.1 Otimização cromatográfica e planejamento fatorial de experimentos

A otimização das condições de cromatografia líquida de alta eficiência sob a maneira clássica se dá conforme sugerido por Snyder e Dolan (1996). Inicia-se o desenvolvimento do método com um gradiente linear exploratório, isto é, uma corrida de 60 minutos onde o solvente orgânico (B) varia de 5 a 100%, gerando uma inclinação equivalente a 1,58 %B/min. A partir do cromatograma obtido, o analista avalia e propõe melhorias variando fase móvel, vazão, gradiente, coluna, temperatura, entre outros fatores que alteram a seletividade e eficiência do método. O objetivo final é obter um cromatograma com o maior número de bandas possível e melhor resolução, em curto período de tempo.

Uma das dificuldades no que diz respeito à etapa de otimização reside no fato que uma diversidade de fatores precisa ser considerada para a eficiência da separação analítica. Características como o fluxo, tamanho da partícula da fase estacionária, tipo e comprimento da coluna, composição e pH da fase móvel, duração do gradiente, temperatura, entre outros, influenciam diretamente no perfil de separação cromatográfica (MARTINS; PEREIRA FILHO; CASS, 2011).

Para Berridge (1987) esses fatores podem ser divididos em dois grupos: aqueles que podem ser controlados e os que não podem ser controlados (Figura 1). Os primeiros correspondem a parâmetros que são ajustados no desenvolvimento do método cromatográfico. Entretanto, existe uma pequena proporção de erro nas análises que se relaciona a características de desempenho do equipamento e da coluna cromatográfica, às quais o analista não consegue modificar. Para o autor, esses fatores devem ser levados em consideração, e a otimização deve seguir alguma estratégia sistemática, que facilite a visualização de cada efeito na resposta esperada.

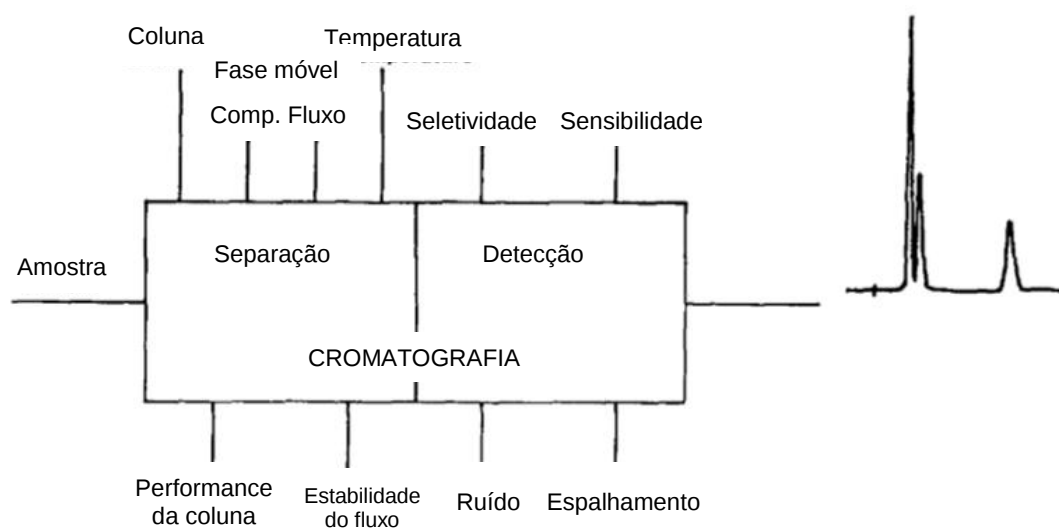


Figura 1 – Fatores controláveis e não controláveis na otimização cromatográfica. Fonte: traduzido de BERRIDGE, 1987.

Entre as técnicas para a avaliação sistemática e planejamento de experimentos, encontram-se os modelos de planejamento fatorial. Esta alternativa é útil para a fase inicial de desenvolvimento e otimização de processos, quando se deseja detectar os fatores mais importantes e seus efeitos sobre a variável resposta escolhida. Também é possível analisar a interação entre esses fatores e avaliar estatisticamente sua relevância na modulação da resposta (GALDAMEZ, 2002).

Um estudo fatorial envolve um arranjo experimental onde são testadas todas as combinações possíveis entre os fatores e níveis avaliados. Os fatores correspondem aos parâmetros responsáveis pela modulação da resposta. Para que os efeitos desses fatores possam ser avaliados, é necessário que se manipulem os valores, ou seja, o mínimo de níveis estudados deve ser dois. Desta forma, o estudo fatorial mais simples é o modelo 2^2 (Tabela 1). Levando em consideração o modelo $2^k = n$, onde 2 é o número de níveis, k , número de variáveis ou fatores e n , número de experimentos, conclui-se que o modelo 2^2 avalia em quatro experimentos dois fatores e dois níveis (MONTGOMERY, 1991).

Tabela 1 – Exemplo de matriz de planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	Fator A	Fator B	Resposta
1	+	+	y_4
2	-	+	y_3
3	+	-	y_2
4	-	-	y_1

A partir de uma matriz de planejamento 2^2 permite-se obter as repostas para todas as combinações entre os dois fatores e os dois níveis estudados, totalizando no mínimo quatro experimentos. No entanto, a determinação experimental não precisa reduzir-se a esta quantidade, pois é muito importante que se repliquem os resultados, permitindo a análise de variância dos mesmos (BARROS NETO; SCARMINIO, BRUNS, 2001).

Na Tabela 1, os níveis estão codificados como “+” para o nível alto e “-” para o nível baixo de cada variável. Os níveis altos e baixos serão arbitrados pelo operador, conforme a faixa de trabalho determinada para o processo em estudo. Um aspecto a considerar é a determinação experimental de pontos centrais e/ou axiais, ou seja, condições intermediárias entre o ponto alto e o baixo; ou condições onde os parâmetros se elevam a medidas superiores à do ponto alto e se reduzem a medidas inferiores ao ponto baixo. A interpretação gráfica deste fenômeno pode ser visualizada na Figura 2.

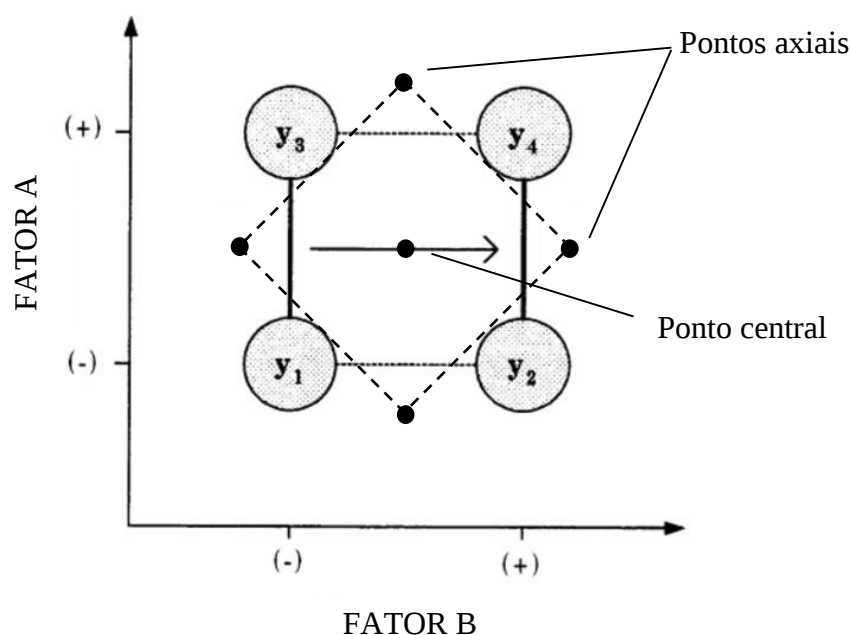


Figura 2 – Interpretação gráfica de um modelo fatorial 2^2 com ponto central e pontos axiais. Fonte: adaptado de BARROS NETO; SCARMINIO, BRUNS, 2001.

Outros modelos podem ser conduzidos na estratégia 2^k ou em combinações personalizadas de fatores e níveis em estudo. No caso da otimização cromatográfica, trata-se de um modelo multifatorial, já que vários parâmetros interferem simultaneamente na resposta. Desta forma, o desenho experimental utilizado passa a ser de elevada complexidade, quando comparado aos modelos 2^k . Neste sentido, as empresas que produzem equipamentos e

suprimentos para CLAE desenvolveram softwares capazes de conduzir estudos fatoriais que avaliam uma grande quantidade de fatores numa quantidade mínima de experimentos chave.

Neste contexto, surge o termo *Quality by Design (QbD)*, que define-se como uma abordagem sistemática que envolve a avaliação simultânea de diversos fatores envolvidos em um objetivo definido, compreendendo o controle do processo a partir de dados científicos sólidos e gerenciamento de riscos de qualidade. Esta abordagem leva ao estabelecimento do *Design Space (DS)*, que é a combinação e interação multidimensional de parâmetros e variáveis de um processo no sentido de garantir a qualidade.

A implementação da QbD só é possível através do uso dos *Design of Experiments (DOE)* ou desenhos experimentais que permitem, após a definição dos parâmetros críticos do processo (PCC), a elaboração de métodos analíticos robustos que, por sua vez, produzirão dados de qualidade (MOLNÁR; RIEGER; MONKS, 2010).

Devido à grande quantidade de experimentos envolvidos num estudo multifatorial, é comum o emprego do modelo fracionário (2^{k-p} , em que p é igual a um quando se realizam metade dos ensaios do estudo fatorial completo), que consiste em reduzir a matriz do planejamento completo a uma fração, tomando experimentalmente parte dos pontos, sem no entanto comprometer a precisão das conclusões obtidas.

Há várias justificativas plausíveis para a utilização dos modelos 2^{k-p} , iniciando pela dispersão dos efeitos, isto é, quando há muitas variáveis de controle é provável que a resposta seja influenciada por alguns efeitos principais e interações de primeira ordem. Além disso, há a capacidade de projeção: os estudos fracionários podem ser construídos em matrizes de estudos fatoriais completos, determinando-se um subconjunto de dados que, quando analisado, permite extrapolação para a realidade da matriz total (GALDAMEZ, 2002).

Muitos estudos contemporâneos vêm sendo desenvolvidos sob a sistemática do planejamento fatorial, para diversas finalidades.

Carillo, Bravo e Zuffal (2011) conduziram um estudo fatorial 2^3 para estudar os efeitos da temperatura, tempo e adição de cloreto de sódio (NaCl) na derivação de aldeídos de Stecker na cerveja. As respostas do estudo foram monitoradas através de um método validado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, e os autores concluíram que todos os fatores contribuem significativamente para a modulação da resposta.

Abdulra'uf e Tan (2013) avaliaram através de um modelo 2^3 os fatores envolvidos na microextração em fase sólidas de resíduos de pesticidas em maçã, monitorando as respostas através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O estudo chegou às condições ótimas de tempo, temperatura e adição de sal para otimizar o fator de diluição dos

analitos, concluindo que este desenho experimental contribui drasticamente para a redução no tempo de preparo de amostras e que é, portanto, rápido e eficiente para a avaliação simultânea de multifatores envolvidos na melhoria de processos.

Karmarkar e colaboradores (2011) utilizaram a abordagem *QbD* para otimizar um método por CLAE para a caracterização de um analgésico, dois conservantes e seus produtos de degradação, no intuito de contribuir com o estudo de estabilidade do mesmo. Os autores conseguiram avaliar simultaneamente a temperatura da coluna, o pH da fase móvel, a concentração inicial de acetonitrila e o tempo de condicionamento. Através dos resultados, obteve-se um método robusto e validado, que conseguiu separar adequadamente os compostos com boa resolução.

Awotwe-Otoo e colaboradores (2012) aplicaram os elementos da *QbD* para desenvolver um método de separação por CLAE em fase reversa dos peptídeos do sulfato de protamina, empregados na terapêutica como anticoagulantes. Foram avaliados o pH da fase móvel, temperatura da coluna, fluxo, volume injetado e concentração de metanol para obter picos bem resolvidos. No estudo, o pH da fase móvel, temperatura da coluna e volume injetado foram determinados como os fatores significativos na resolução cromatográfica. Os autores validaram o método e defendem abordagens sistemáticas para desenvolver métodos cromatográficos robustos.

Outra abordagem sistemática envolvendo *QbD-DOE* foi conduzida por Garg e colaboradores (2013), que desenvolveram e validaram um método cromatográfico para o estudo de estabilidade do montelucaste, avaliando fatores como pH da fase móvel, fluxo, temperatura e concentração de modificador orgânico através de um estudo fatorial fracionário 2^{4-1} com dois pontos centrais e adotando a resolução como critério de resposta. Os pesquisadores determinaram a partir de 10 experimentos as condições ótimas de análise, que permitiram a validação e implantação do método em laboratórios de controle de qualidade.

Tappin e colaboradores (2008) desenvolveram e validaram um método por CLAE para a determinação de tretanortriterpenoides no óleo essencial de *Carapa guainensis* cuja otimização ocorreu num desenho experimental que avaliou vários fatores importantes simultaneamente, contribuindo com a validação.

No mesmo sentido, Bianchini, Castellano e Kaufman (2009) desenvolveram através do *Design Space* um método cromatográfico simples e rápido para a determinação simultânea de diferentes impurezas no mesilato de pridinol, provando a robustez, precisão e seletividade do método, indicando sua utilidade no controle de qualidade.

2.2.2 Análise exploratória de dados cromatográficos

A cromatografia *fingerprint* oferece uma grande quantidade de dados a serem explorados. A soma desses dados oferece uma informação completa a respeito do extrato analisado, subsidiando boas referências de controle de qualidade. No entanto, a análises de matrizes de dados tão extensas e complexas não é possível por estatística simples.

Da mesma forma que o estudo fatorial conta com métodos estatísticos multivariados, a comparação de matemática de *fingerprints* necessita desse recurso. A análise exploratória dos dados é efetuada para retirar de um conjunto de dados o máximo de informação química possível, e nisso consiste a quimiometria (BELTRAME, 2005).

Hoje a quimiometria é considerada uma das melhores estratégias de interpretação de dados químicos em sistemas multivariados, por permitir classificar amostras segundo suas semelhanças ou identificar variáveis de interesse (MARTINS, 2009).

A análise exploratória consiste em duas medidas de similaridade principais: a análise de componentes principais (ACP) e a análise de agrupamento hierárquico (AAH).

A ACP consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois embora a informação estatística presente nas n variáveis originais seja a mesma dos n componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação (NETO; MOITA, 1998).

A AAH interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras (NETO; MOITA, 1998).

Alguns estudos apontam resultados interessantes que relacionam a associação de técnicas cromatográficas e análises estatísticas para a análise de extratos vegetais.

Beltrame e colaboradores (2006) desenvolveram e validaram um método analítico por CLAE para avaliar a qualidade de amostras comerciais de *Trichilia catigua* L. e fizeram uma classificação de amostras comerciais empregando a quimiometria.

Peng e colaboradores (2011) analisaram por quimiometria os cromatogramas *fingerprint* obtidos por CLAE da espécie *Artemisia selengensis* Turcz, e concluíram que as análises multivariadas são úteis para compreender os dados químicos, mostrando que essa é uma

associação útil, por se apresentar como um método rápido e conclusivo na avaliação da qualidade de produtos da medicina tradicional chinesa.

Pan e colaboradores (2011) utilizaram CG para a obtenção dos *fingerprint* de *Scutellaria barbata* D. Don, com posterior quantificação de marcadores quimiotaxonômicos e análises quimiométricas, conseguindo identificar, através da análise de similaridade entre os cromatogramas, dois adulterantes no grupo amostral analisado, permitindo concluir a importância e a eficiência da quimiometria na avaliação da qualidade de plantas medicinais.

Ainda, Chen e colaboradores (2008) analisaram por quimiometria várias amostras de *Ganoderma lucidum*, cujos cromatogramas *fingerprint* foram obtidos por CLAE. Por haver variações químicas e morfológicas dentro da espécie, a análise visual dos cromatogramas não é conclusiva. Contudo, o tratamento dos dados através de análises estatísticas multivariadas permite a dedução da qualidade das amostras. Os autores concluíram que, além disso, é interessante a quantificação de marcadores químicos da espécie, permitindo a comparação dos vegetais provenientes de fontes diferentes.

Por fim, Li e colaboradores (2012) desenvolveram um método utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para a determinação de cinco saponinas triterpênicas em espécies do gênero *Ilex*, visando diferenciar as espécies conforme a distribuição quantitativa destes componentes no extrato bruto. Os autores validaram a metodologia desenvolvida e sugerem que, além de rápido, o método é eficiente para avaliar a qualidade e estabelecer diferenças entre as espécies do gênero *Ilex*.

2.3 Erva-mate

A erva-mate é uma árvore descrita botanicamente por Auguste Saint Hilaire em 1822, denominada cientificamente como *Ilex paraguariensis* e pertencente à família Aquifoliaceae (Figura 3). Seu caule pode atingir 50 cm de diâmetro, com ramos cilíndricos ou semi cilíndricos, atingindo usualmente de 2 a 7 metros de altura. Possui folhas subcoriáceas até coriáceas de pecíolo curto e tamanho médio de 8 a 10 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura (CANSIAN, 2003).

O consumo da erva-mate no sul do Brasil é um hábito bastante antigo, iniciado por tribos indígenas que creditavam à espécie poderes sobrenaturais. No Paraná e no Rio Grande do Sul sua utilização se destaca na preparação do chimarrão, que consiste na infusão das partes aéreas torradas e trituradas em água quente.

Outras utilidades para esta planta e seus extratos vêm se destacando no mercado nacional e mundial, como matéria prima para o preparo de medicamentos, cosméticos, corantes, bebidas e suplementos alimentares (PEREIRA et al., 2013). A indústria ervateira brasileira produz mais de 200 mil toneladas do produto por ano, sendo que parte desta produção é exportada para países como Chile, Estados Unidos, França e Espanha (PARANÁ, 2013).



Figura 3 – Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Fonte: O Autor.

Diversos estudos vêm sendo publicados envolvendo a espécie *I. paraguariensis*, tanto na perspectiva de elucidar sua caracterização química, quanto testar sua atividade biológica frente a variados modelos. Vários ensaios comprovam a atividade antioxidante da erva-mate, como Matsumoto (2008), que demonstrou que o consumo de uma única dose diária de chá mate aumenta significativamente o perfil de antioxidantes plasmáticos e, inclusive, a expressão de genes antioxidantes, como os relacionados às enzimas glutathionaperoxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Outros estudos corroboram a teoria da atividade antioxidante, discutindo que os compostos fenólicos são os principais responsáveis, e demonstrando a proteção do plasma e das

lipoproteínas de baixa densidade (LDL) à peroxidação, como o apresentado por Silva e colaboradores (2008) e Peralta e colaboradores (2012) que demonstram que a administração aguda do chá mate em animais causa uma variação pequena, porém significativa no perfil antioxidante plasmático.

Ainda, Boaventura e colaboradores (2012) associaram dieta alimentar e administração de chá mate em pacientes com dislipidemia, e avaliaram marcadores do *stress* oxidativo. Estes autores concluíram que o consumo a longo prazo do chá mate promoveu melhora nos parâmetros antioxidantes plasmáticos nestes pacientes, bem como aumento na concentração de glutathione e, ainda, redução nos níveis de LDL-colesterol, indicando o chá-mate como um interessante suplemento alimentar para a prevenção de doenças cardiovasculares.

Gosman e colaboradores (2012) testaram o efeito das frações do extrato-bruto de erva-mate nos pré-adipócitos, e apresentaram resultados demonstrando que a porção dos compostos fenólicos inibe o armazenamento de lipídeos nos adipócitos, além de sugerir que os mesmos compostos podem estar envolvidos na expressão de genes que inibem a adipogênese.

Efeitos anti-obesidade e antidiabéticos da erva-mate foram avaliados em ratos. Nestes estudos foram demonstrados que os compostos fenólicos e saponinas presentes no extrato de *I. paraguariensis* são responsáveis por sua potente atividade anti-obesidade *in vivo*. Ainda, o ácido clorogênico, importante polifenólico da erva-mate, parece exercer atividade moduladora sobre a enzima glicose-6-fosfatase, conferindo maior tolerância à glicose em ratos obesos. Além disso, a perda de peso em ratos pode estar associada ao poder anorexígeno dos extratos de erva-mate. As ações no organismo podem ocorrer devido ao sinergismo entre os vários compostos bioativos presentes na espécie (HUSSEIN et al., 2011; KANG et al., 2012).

Arçari e colaboradores (2011) demonstraram o potencial antiinflamatório do extrato de erva-mate em ratos com obesidade induzida, sugerindo possível inibição do fator tumoral alfa (TNF- α) hepático e restauração da sinalização hepática e muscular da insulina.

Prediger e colaboradores (2008) avaliaram em modelos animais os efeitos do extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* no aprendizado e memória, concluindo que o sinergismo entre vários compostos pode reduzir o déficit cognitivo associado a doenças neurodegenerativas (como a doença de Parkinson), e sugerem que o consumo contínuo de chá mate por diversas populações pode representar um fator profilático em relação a essas desordens.

Em outro estudo avaliou-se a correlação entre o consumo de chá mate e a densidade óssea mineral após a menopausa. Sugeriu-se efeito protetor de *I. paraguariensis* contra a osteoporose, especialmente na coluna lombar e fêmur (CONFORTI; GALLO; SARAVÍ, 2012).

Burris e colaboradores (2011) testaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que se mostrou ativo mesmo em concentrações relativamente baixas.

Wnuk e colaboradores (2009) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato de erva-mate em linfócitos humanos *in vitro*. Estes pesquisadores indicaram que não há indícios epidemiológicos plausíveis que tratem a cafeína ou outros componentes como carcinógenos.

Por outro lado, outros estudos que avaliam a toxicidade da espécie *I. paraguariensis* inferem que ela possa ser um fator potencializador de carcinogênese, quando combinada com outros fatores de risco (JOTZ *et al.*, 2006; WNUK *et al.*, 2009).

Em outro aspecto, há várias publicações envolvendo estudos fitoquímicos para determinar a presença de metabólitos secundários na espécie *Ilex paraguariensis*.

Acredita-se que a maior parte dos inúmeros compostos isolados da erva-mate sejam benéficos à saúde. Com isto, busca-se constantemente comprovar estas atividades. Dentre estes, duas classes de compostos são encontradas em maior quantidade: os polifenóis (ácidos clorogênicos, ácido cafeico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e as xantinas (cafeína e teobromina), seguido pelos flavonóides (quercetina, caempferol e rutina); aminoácidos, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas (C, B1 e B2) (POMILIO; TRAJTEMBERG; VITALE, 2002)

Athayde e colaboradores (2000) encontraram as xantinas cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina), que são uma classe de alcalóides de purina encontradas em muitas outras plantas. Destas, a cafeína é encontrada em concentrações mais elevadas, 1 a 2% do peso seco da planta, seguida pela teobromina, 0,3 a 0,9% do peso seco.

Análises através de extração por fluido supercrítico associada a métodos cromatográficos revelaram 51 compostos, entre ésteres, ácidos graxos, hidrocarbonetos, fitosteróis, álcool, xantinas e vitamina E (JACQUES *et al.*, 2007).

Filip e colaboradores (2001) incluíram nesta gama de moléculas conhecidas na erva-mate, os derivados de cafeoil (ácidos cafeoilquínicos): ácido cafeico, ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), ácido *neo*-clorogênico, ácido *crypto*-clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico que, por estarem em altas concentrações na espécie *Ilex paraguariensis*, a diferencia das demais espécies de *Ilex* que podem ser utilizadas como adulterantes na composição do mate (*I. brevicuspis*, *I. argentina* e *I. dumosa*), as quais possuem concentrações muito baixas desses compostos.

Pagliosa e colaboradores (2010) demonstraram que entre os órgãos desta espécie, o caule concentra ácido clorogênico e ácido 4,5-dicafeiolquínico no extrato metanólico. Já as metilxantinas podem aparecer em concentrações razoáveis tanto no caule quanto nas folhas.

Dugo e colaboradores (2009) caracterizaram 26 substâncias entre metilxantinas e polifenóis, em que 80% representam os ácidos quínicos-hidroxicinâmicos.

Peixoto e colaboradores (2011) detectaram alto teor de saponinas nos frutos imaturos, assim como Canto (2007), que avaliou, ainda, a eficiência dessas saponinas com fins tecnológicos de emulsificante.

Demonstra-se a partir dos dados bibliográficos levantados que há muitos estudos que sugerem possíveis efeitos biológicos e utilidades para a erva-mate. Verifica-se ainda que trata-se de uma espécie cujo cultivo se concentra na região centro-sul do Brasil e em alguns países da América Latina, onde também é mais frequente o seu consumo.

Este cenário caracteriza a erva-mate como uma espécie promissora em diversos ramos da economia, o que provoca a demanda de metodologias que permitam a avaliação rápida e eficiente da qualidade dessa matéria-prima vegetal. Neste contexto, a presente pesquisa demonstra que ferramentas químicas e estatísticas podem ser úteis na condução do controle de qualidade, objetivando analisar simultaneamente a autenticidade botânica, bem como características qualitativas e quantitativas referentes ao objeto de estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um método eficiente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que permita a avaliação qualitativa e quantitativa da qualidade de extratos de *Ilex paraguariensis* (erva-mate).

3.2 Específicos

Estudar os diversos fatores envolvidos na seletividade e eficiência do método cromatográfico.

Otimizar racionalmente a condição cromatográfica para a obtenção de um *fingerprint*.

Obter os cromatogramas *fingerprint* de amostras comerciais e analisar sua similaridade empregando técnicas de análise multivariada.

Desenvolver um método quantitativo para a determinação simultânea de cafeína, teobromina e ácido clorogênico em amostras de erva-mate.

Validar as metodologias desenvolvidas no estudo conforme a legislação brasileira vigente.

Aplicar os métodos desenvolvidos para a análise de amostras comerciais de erva-mate.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Uma amostra vegetal de *Ilex paraguariensis* utilizado para a produção industrial de erva-mate pela indústria ervateira Bitumirim foi obtida na Fazenda Vila Nova, situada na região de Ivaí-PR (coordenadas: -24° 56' 8.286", -50° 53' 24.5472"). Uma exsicata foi depositada sob o número 19415 para classificação botânica no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa. As partes aéreas da planta foram submetidas a uma rápida exposição ao fogo, ainda na ervateira. Após, foram dessecadas a 50 °C por 20 horas, trituradas, tamisadas e armazenadas. O processamento da amostra seguiu o roteiro de processamento industrial para a obtenção da erva para chimarrão. Outras seis amostras comercializadas como erva-mate para chimarrão foram adquiridas no comércio pontagrossense. As amostras comerciais consistem nas partes aéreas da planta dessecadas, torradas e acondicionadas em embalagens de papel (partícula média = 2,5 mm). A procedência das amostras está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Origem das amostras de erva-mate analisadas.

Codificação	Local de produção
Amostra 1	Guarapuava – PR
Amostra 2 (padrão)	Ivaí – PR
Amostra 3	Curitiba – PR
Amostra 4	Guamiranga – PR
Amostra 5	Laranjeiras do Sul – PR
Amostra 6	Palmas – PR
Amostra 7	Catanduvas – SC

4.2 Reagentes

Etanol grau analítico (Synth, Diadema-SP, Brasil); água purificada (destilada e deionizada); ácido gálico (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); carbonato de sódio (Synth, Diadema-SP, Brasil); quercetina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); ácido acético (Synth, Diadema-SP, Brasil); metanol grau analítico (Merck, São Paulo-SP, Brasil); cloreto de alumínio (Merck, São Paulo-SP, Brasil); acetato de etila (Synth, Diadema-SP, Brasil); acetona (Rhodia, São Paulo-SP, Brasil); metenamina (Royal

Química, Osasco-SP, Brasil); ácido clorídrico (Braskem, São Paulo-SP, Brasil); acetonitrila (ACN) grau CLAE (Merck, São Paulo-SP, Brasil); metanol (MeOH) grau CLAE (J.T. Baker, Philipsburg-PA, EUA); ácido fórmico grau analítico (Synth, Diadema-SP, Brasil). A água utilizada para cromatografia foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo-SP, Brasil). Os padrões primários de cafeína (99% de pureza), teobromina (99% de pureza) e ácido clorogênico (95% de pureza) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA).

4.3 Preparo dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos (H) foram preparados a partir das sete amostras obtidas. Para tanto, 100 gramas de material vegetal foram submetidos ao processo de maceração com 500 mL de mistura hidroetanólica a 80% (v/v) pelo período de 7 dias. Após este período, os extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador, liofilizados e armazenados sob refrigeração (4° C) até o momento do uso.

Os extratos aquosos (A) foram preparados a partir das sete amostras e visou mimetizar o preparo de chimarrão, principal forma de consumo da erva-mate. Dessa forma, o material vegetal foi submetido ao processo de infusão em água purificada a 80 °C por 30 minutos. A proporção planta/solvente foi de 25 gramas de material vegetal para 500 mL do solvente. Após resfriados, os extratos foram concentrados, liofilizados e armazenados sob refrigeração (4° C) até o momento do uso.

4.4 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico

4.4.1 Instrumentação e colunas cromatográficas

Os experimentos foram realizados em dois sistemas cromatográficos. O desenvolvimento do método ocorreu num sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters® Acquity UPLC System (Milford, EUA), equipado com uma bomba binária de liberação de solvente, autoinjeter, e detector de arranjo de diodos. O sinal foi monitorado pelo software Empower-2®. A aplicação do método foi efetivada num sistema de cromatografia líquida de alta performance Waters® 2695 Alliance HPLC System (Milford, EUA), composto por uma bomba quartenária, degaseificador *on-line*, autoinjeter e detector de arranjo de diodos.

Para o desenvolvimento, foram testadas quatro colunas cromatográficas com características químicas distintas: HSS T₃ 50 x 2,1 mm, 1,7 µm (Waters, SP, Brasil); BEH C₈

50 x 2,1 mm, 1,7 μm (Waters, SP, Brasil); CSH PFP 50 x 2,1 mm, 1,7 μm (Waters, SP, Brasil); CSH fenil-hexil 50 x 2,1 mm, 1,7 μm (Waters, SP, Brasil). Contudo, na etapa da validação foi empregada uma coluna XBridge C₈ 75 x 4,6 mm, 2,5 μm (Waters, SP, Brasil). Os cromatogramas foram obtidos na faixa de 200-400 nm com monitoramento em 280 nm.

4.4.2 Otimização das condições cromatográficas

Um estudo fatorial foi desenvolvido em duas etapas: a varredura e a otimização do cromatograma *fingerprint*. Na varredura inicial, foram avaliadas variáveis qualitativas, como a característica química da coluna, composição da fase móvel, faixa de pH e tempo de corrida. A avaliação desses fatores totalizou 45 experimentos, e os parâmetros podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Fatores avaliados na fase da varredura do desenho experimental.

Corrida	Modificador orgânico	Tempo de gradiente (min)	pH	Coluna ^a
1	Acetonitrila	12,0	2,4	BEH C ₈
2	Acetonitrila	12,0	2,4	CSH PFP
3	Acetonitrila	5,0	2,4	CSH PFP
4	Acetonitrila	12,0	2,4	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
5	Acetonitrila	5,0	2,4	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
6	Acetonitrila	8,5	2,4	HSS T ₃
7	Acetonitrila	5,0	2,4	CSH PFP
8	Acetonitrila	8,5	5,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
9	Acetonitrila	8,5	5,0	HSS T ₃
10	Acetonitrila	8,5	5,0	BEH C ₈
11	Acetonitrila	5,0	5,0	BEH C ₈
12	Acetonitrila	8,5	5,0	HSS T ₃
13	Acetonitrila	8,5	5,0	BEH C ₈
14	Acetonitrila	8,5	5,0	CSH PFP
15	Acetonitrila	8,5	5,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
16	Acetonitrila	8,5	5,0	CSH PFP
17	Acetonitrila	8,5	7,0	CSH PFP
18	Acetonitrila	12,0	7,0	CSH PFP
19	Acetonitrila	5,5	7,0	HSS T ₃
20	Acetonitrila	12,0	7,0	BEH C ₈
21	Acetonitrila	12,0	7,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>

22	Acetonitrila	5,0	7,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
23	Metanol	5,0	2,4	BEH C ₈
24	Metanol	12,0	2,4	HSS T ₃
25	Metanol	8,5	2,4	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
26	Metanol	5,0	2,4	HSS T ₃
27	Metanol	12,0	2,4	HSS T ₃
28	Metanol	10,3	2,4	CSH PFP
29	Metanol	8,5	5,0	HSS T ₃
30	Metanol	8,5	5,0	HSS T ₃
31	Metanol	8,5	5,0	CSH PFP
32	Metanol	8,5	5,0	BEH C ₈
33	Metanol	8,5	5,0	BEH C ₈
34	Metanol	8,5	5,0	CSH PFP
35	Metanol	8,5	5,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
36	Metanol	8,5	5,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
37	Metanol	12,0	5,0	BEH C ₈
38	Metanol	5,0	5,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
39	Metanol	8,5	7,0	BEH C ₈
40	Metanol	6,8	7,0	HSS T ₃
41	Metanol	12,0	7,0	CSH PFP
42	Metanol	5,0	7,0	CSH PFP
43	Metanol	6,8	7,0	BEH C ₈
44	Metanol	10,3	7,0	CSH <i>phenyl-hexyl</i>
45	Metanol	12,0	7,0	CSH PFP

Nota: ^a Colunas: BEH C₈: *Ethylene bridged hybrid* (híbrida com ligação de etileno); CSH PFP: *Charged surface hybrid – propyl fluoro phenyl* (híbrida de superfície carregada – propilfluorfenil); HSS T₃: *High strenght sílica* (sílica de alta resistência de fase alquílica trifuncional C₁₈); CSH *phenyl-hexyl*: *Charged surface hybrid phenyl-hexyl* (híbrida de superfície carregada – fenil-hexil).

A partir dos resultados obtidos, uma segunda etapa foi executada. Neste caso, as variáveis quantitativas foram analisadas e as variáveis qualitativas selecionadas na varredura foram fixadas. Os parâmetros avaliados (Tabela 3) demandaram 39 corridas.

Tabela 3 – Fatores avaliados na fase de otimização do desenho experimental.

Corrida	Fluxo (mL/min)	% final de orgânico	Temperatura (°C)	pH
1	0,400	70,0	25,0	2,17
2	0,400	62,5	25,0	2,17
3	0,700	70,0	25,0	2,17

4	0,700	55,0	25,0	2,17
5	0,400	55,0	25,0	2,40
6	0,600	62,5	25,0	2,40
7	0,400	70,0	25,0	3,00
8	0,700	70,0	25,0	3,00
9	0,700	55,0	25,0	3,00
10	0,700	62,5	25,0	3,00
11	0,400	70,0	25,0	3,00
12	0,600	66,3	30,0	2,17
13	0,600	58,8	30,0	2,17
14	0,400	55,0	30,0	2,17
15	0,700	62,5	30,0	2,40
16	0,600	62,5	30,0	2,40
17	0,600	62,5	30,0	2,40
18	0,600	55,0	30,0	3,00
19	0,700	70,0	30,0	3,00
20	0,500	66,3	30,0	3,00
21	0,500	58,8	30,0	3,00
22	0,500	66,3	35,0	2,17
23	0,500	58,8	35,0	2,17
24	0,600	66,3	35,0	3,00
25	0,600	58,8	35,0	3,00
26	0,700	62,5	40,0	2,17
27	0,400	55,0	40,0	2,17
28	0,400	62,5	40,0	2,17
29	0,700	70,0	40,0	2,17
30	0,700	70,0	40,0	2,17
31	0,700	55,0	40,0	2,17
32	0,400	70,0	40,0	2,40
33	0,600	55,0	40,0	2,40
34	0,700	55,0	40,0	3,00
35	0,700	62,5	40,0	3,00
36	0,400	55,0	40,0	3,00
37	0,400	62,5	40,0	3,00
38	0,600	70,0	40,0	3,00
39	0,400	55,0	40,0	3,00

Os dados foram processados no software *Waters Acquity UPLC® H-Class Method Development System*, gentilmente cedido pelo Laboratório de Aplicações Luís Barsotti, da Waters do Brasil (São Paulo, SP). O critério de resposta selecionado foi a maior quantidade de picos com resolução superior a 1,5. A condição otimizada foi transportada para a plataforma CLAE.

4.5 Validação e aplicação do método nas amostras comerciais

A validação do método quantitativo para cafeína, teobromina e ácido clorogênico foi conduzida de acordo com os parâmetros da RE nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do ICH Q2R1 (*International Conference of Harmonisation*).

4.5.1 Preparo dos padrões

Uma solução estoque (200 mL) de cada padrão foi preparada em balão volumétrico, às concentrações de 0,5 mg/mL para a cafeína, e 0,2 mg/mL para a teobromina e ácido clorogênico. Os padrões foram diluídos precisamente em água:metanol 80:20 (v/v), com auxílio de micropipetas calibradas.

4.5.2 Preparo das amostras

Os extratos liofilizados foram precisamente pesados (1 mg) e diluídos em volume apropriado (1mL) de água:metanol 80:20 (v/v), com auxílio de micropipetas calibradas, obtendo-se a concentração de 1 mg/mL. As amostras foram então filtradas em microfiltros de 0,22 µm (Waters do Brasil) e acondicionadas em *vials*.

4.5.3 Curva de calibração

Utilizando alíquotas apropriadas das soluções-mãe dos padrões de cafeína, teobromina e ácido clorogênico, foram obtidas as seguintes concentrações para a curva de calibração: 0,08; 0,24; 0,27; 0,30; 0,33; 0,36 e 0,40 µg/mL para a cafeína; 0,1; 0,40; 0,44; 0,48; 0,52; 0,56 e 0,70 µg/mL para a teobromina; e 0,04; 0,16; 0,18; 0,20; 0,22; 0,24 e 0,36 µg/mL para o ácido clorogênico. As amostras foram filtradas em microfiltros de 0,22 µm (Waters do Brasil) antes

da injeção no cromatógrafo. Um mililitro (1 mL) de cada solução foi transferida para *vials*. Alíquotas de 10 µL foram injetadas no sistema cromatográfico.

Cada ponto foi preparado em triplicata. A curva de calibração foi obtida plotando no plano cartesiano a área do pico *versus* a concentração conhecida do analito. Um mínimo de 5 pontos foi considerado para a curva de calibração.

4.5.4 Curva de adição de padrão

Alíquotas de cada padrão foram adicionadas a uma quantidade constante do extrato aquoso de erva-mate (1 mL), de forma a reproduzir os pontos da curva de calibração. As amostras foram preparadas em triplicata, conforme o descrito na sessão 4.5.1. A curva de calibração foi obtida plotando no plano cartesiano a área do pico *versus* a concentração conhecida do analito.

4.5.5 Recuperação, precisão intermediária e precisão

A recuperação relativa foi obtida usando três soluções de controle de qualidade (em concentrações diferentes dos pontos da curva de calibração), preparados a partir das soluções-mãe, de forma a obter as concentrações de 0,15; 0,25 e 0,35 µg/mL para a cafeína, 0,02; 0,05 e 0,06 µg/mL para a teobromina e 0,10; 0,25 e 0,30 µg/mL para o ácido clorogênico. A área dos picos de três soluções filtradas a 0,22 µm foram comparadas com a área dos picos de soluções de mesma concentração não filtradas, para derivar o percentual de recuperação.

A precisão inter e intradia foram avaliadas pela replicação da análise das três soluções controle utilizadas para o experimento da recuperação. Triplicatas de cada concentração foram analisadas em três dias não consecutivos.

A precisão do método foi determinada através da determinação do coeficiente de variação das replicatas (RE 899/2003 – ANVISA). A exatidão foi determinada pelo cálculo da razão entre os valores médios encontrados para as diferentes concentrações analisadas e o valor médio teórico das mesmas.

4.5.6 Seletividade

Um arranjo de fotodiodos foi utilizado para identificar os marcadores e verificar a pureza dos picos obtidos nos cromatogramas dos extratos. Os fatores de retenção dos padrões foram também utilizados para a identificação na corrida analítica.

4.5.7 Limites inferiores de detecção (LID) e de quantificação (LIQ)

O limite inferior de detecção (LID) foi calculado pela tomada da relação sinal-ruído igual a três, enquanto que o limite inferior de quantificação (LIQ) teve como critério a relação sinal-ruído igual a dez. Ainda, o LIQ levou em conta as medidas que apresentassem precisão adequada, isto é, coeficiente de variação menor do que 20% entre as réplicas da mesma amostra.

4.5.8 Quantificação de cafeína, teobromina e ácido clorogênico nas amostras comerciais

Os extratos das amostras (14 extratos) foram injetados em triplicata no sistema cromatográfico. As áreas foram integradas e medidas, procedendo-se à quantificação dos marcadores químicos.

4.6 Quantificação de polifenólicos totais por espectrofotometria

A análise quantitativa de polifenólicos totais foi executada de acordo com o sugerido pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

4.6.1 Determinação da curva de calibração

Dissolveu-se 250 mg de ácido gálico em 50 mL de água (obtendo a concentração de 5000 µg/mL). Desta solução, separaram-se as quantidades de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 e 1,6 mL em balões volumétricos de 10 mL e completou-se com água destilada, obtendo-se as concentrações de 50, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. Destas soluções, foi transferido o volume de 0,1 mL para tubos de ensaio contendo 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e 7 mL de água destilada. Após 30 segundos, foi adicionado a cada um dos balões 2,5 mL de carbonato de sódio 10,6% (p/v). Os tubos foram levados ao banho-maria a 50°C por 5

minutos. Depois desse período, as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e procedeu-se a leitura das absorbâncias em 760 nm.

4.6.2 Determinação de polifenólicos totais nas amostras

Para determinação de polifenólicos totais nas amostras, foi utilizada uma solução de 0,05 g de amostra em 50 mL de etanol 80%. Dessa amostra, aliquotou-se 0,2 mL e, em tubo de ensaio, adicionou-se 7 mL de água, 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e, após 30 segundos, 2,5 mL de carbonato de sódio 10,6% (p/v). As amostras foram aquecidas em banho-maria durante 5 minutos a 50°C. Após o resfriamento, foram tomadas as leituras das absorbâncias em 760 nm.

4.7 Quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria

A análise quantitativa de flavonoides totais foi executada de acordo com o sugerido pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

4.7.1 Determinação da curva de calibração

Foi preparada uma solução de 10 mg de quercetina em 10 mL de metanol (obtendo-se a concentração de 1000 µg/mL). Diliui-se 0,5 mL dessa solução em 10 mL de solução de ácido acético metanólico. Dessa solução foram preparadas 6 outras (com 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL cada uma), com a quantidade necessária de amostra, 4 mL de acetato de etila, 0,4 mL de cloreto de alumínio e completada em balão volumétrico de 10 mL com ácido acético metanólico. O branco foi preparado com 4 mL de acetato de etila e completado em balão volumétrico de 10 mL com ácido acético metanólico.

4.7.2 Determinação de flavonoides totais nas amostras

Para o preparo da solução-mãe, pesou-se 0,4 g de amostra e colocou-se em balão de fundo redondo de 100 mL. Acrescentou-se 1 mL de solução de metenamina, 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. A solução foi aquecida sob refluxo. Após, foi resfriada e filtrada para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi ajustado com acetona. Em funil de separação, realizou-se extração líquido-líquido de 20 mL dessa solução com: a) 20 mL de água e 15 mL

de acetato de etila; b) três extrações com 10 mL de acetato de etila. A fase orgânica resultante foi lavada duas vezes em funil de separação com 50 mL de água destilada e posteriormente transferida para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com acetato de etila.

A solução-amostra foi preparada em balão volumétrico de 10 mL, com 4 mL da solução-mãe, 0,4 mL de cloreto de alumínio e o volume foi completado com solução metanólica de ácido acético.

A solução-branco foi preparada em balão volumétrico de 10 mL, com 4 mL da solução-mãe e o volume foi completado com solução metanólica de ácido acético.

A absorbância foi medida em 425 nm, após 30 minutos.

As análises foram realizadas em triplicata.

4.8 Quimiometria

4.8.1 Alinhamento de bandas

Devido às condições intrínsecas dos métodos cromatográficos, podem ocorrer pequenas variações nos dados obtidos, resultando em picos que não se situam na mesma coluna da matriz (LIANG; XIE; CHAN, 2004).

Diversos estudos tem demonstrado a importância do tratamento matemático dos dados cromatográficos (MARTINZ; PEREIRA-FILHO; CASS, 2011). Desta forma, o algoritmo COW (*Correlation Optimized Warping*) foi empregado (SKOV et al., 2006). A amostra 2 foi adotada como referência e as demais amostras foram subsequentemente alinhadas. A rotina foi executada no *software* Matlab v. 7.5 (MathWorks Inc., Natick, EUA).

4.8.2 Análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico

A análise de componentes principais (ACP) e a análise de agrupamento hierárquico (AAH) foram implementadas no *software* Matlab v. 7.5 (MathWorks Inc., Natick, EUA). Para tanto, uma matriz composta pelas triplicatas das amostras ($n = 48$) e respostas ($n = 5.700$) foi construída, totalizando 273.600 pontos de dados. Os resultados obtidos para cada parâmetro foram atribuídos às colunas e as amostras dos extratos às linhas.

A ACP foi aplicada para separar os extratos obtidos de acordo com seus cromatogramas *fingerprint*. A AAH foi desenvolvida para sugerir semelhanças e agrupar as amostras. Assim,

as similaridades foram calculadas baseando-se na distância Euclideana, e o método incremental foi utilizado para formar e sugerir os grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A procura constante da população por alimentos com fins nutracêuticos e o uso destes como estratégias alternativas para o tratamento e prevenção de doenças tem movimentado o mercado de produtos vegetais (medicinais). Desta forma, ressalta-se a necessidade da garantia da qualidade das matérias-primas vegetais, que serão empregadas na produção de formas farmacêuticas, alimentícias, cosméticas ou destinadas à utilização direta do consumidor.

Os extratos vegetais a serem usados no preparo destes produtos consistem em matrizes complexas, pois neles estão contidos uma diversidade de substâncias químicas denominadas metabólitos secundários. Essas substâncias são as principais responsáveis pela atividade terapêutica/nutracêutica do vegetal e podem agir de maneira isolada ou, em muitos casos, de maneira sinérgica, como um fitocomplexo (SIMÕES et al., 2008).

Percebe-se, então, a importância de se quantificar os principais componentes desses produtos por meio da avaliação de marcadores químicos de interesse, e, ainda, também, avaliar a composição global destes produtos de forma qualitativa, considerando que o sinergismo entre as substâncias presentes nestes produtos consiste justamente na interação entre duas ou mais substâncias para gerar ou potencializar os efeitos biológicos.

Para tanto, diferentes metodologias analíticas podem ser usadas conforme pode ser verificado pela avaliação das monografias relacionadas a plantas e extratos vegetais presentes nas diversas edições da Farmacopeia Brasileira. Técnicas espectroscópicas, gravimétricas e principalmente cromatográficas abundam na 5ª edição do compêndio (BRASIL, 2013), sendo muitas vezes sugerida a técnica por CLAE para o estudo qualitativo e quantitativo da composição química das plantas medicinais presentes neste documento.

Assim, justifica-se a presença dos cromatógrafos líquidos e outros equipamentos nos laboratórios de controle de qualidade, especialmente quando se deseja realizar a análise destes produtos, o que ressalta a importância do interesse na realização - e a posterior consulta - de trabalhos como o presente.

5.1 Quantificação de polifenólicos totais e flavonoides totais

A quantificação de polifenólicos e flavonoides totais foi obtida pelo do método farmacopeico por espectrofotometria UV-Vis. Os resultados extraídos deste procedimento analítico estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4 – Quantificação de polifenólicos e flavonoides totais nos extratos de erva-mate pelo método de Folin-Ciocalteu.

Amostra	Polifenólicos totais (µg/g de extrato)		Flavonoides totais (µg/g de extrato)	
	A	H	A	H
Amostra 1	9,23 ± 0,087	7,92 ± 0,110	0,93 ± 0,024	2,16 ± 0,197
Amostra 2	8,52 ± 0,046	9,18 ± 0,083	1,01 ± 0,018	5,37 ± 0,047
Amostra 3	9,20 ± 0,046	6,13 ± 0,178	0,72 ± 0,018	2,18 ± 0,127
Amostra 4	10,12 ± 0,090	8,37 ± 0,144	0,60 ± 0,030	4,31 ± 0,081
Amostra 5	10,13 ± 0,277	13,89 ± 0,087	0,60 ± 0,024	4,28 ± 0,104
Amostra 6	10,40 ± 0,070	13,20 ± 0,202	0,65 ± 0,018	4,05 ± 0,074
Amostra 7	*	11,53 ± 0,140	*	3,99 ± 0,090

NOTA: A = extrato aquoso; H = extrato hidroalcoólico. *resultado não observado por indisponibilidade de amostra. Resultado expresso em média das triplicatas ± desvio padrão.

A quantificação de polifenólicos totais revela certa heterogeneidade nos teores, especialmente nos extratos hidroalcoólicos. Entretanto, comparando-se o grupo aquoso com o grupo hidroalcoólico, verifica-se que não há diferença estatística ($p > 0,05$; teste de Wilcoxon não pareado). Já no caso dos flavonoides totais é possível concluir que os dois grupos são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon não pareado).

A diferença essencial entre esses grupos de amostras consiste no solvente extrator: etanol 80% para os extratos hidroalcoólicos e água pura para os extratos aquosos. Portanto, é possível destacar que foi possível extrair polifenólicos em quantidades semelhantes tanto na água, como em misturas hidroalcoólicas. Em contrapartida, os flavonoides foram melhor solubilizados no etanol.

Bravo, Goya e Lecumberri (2007) quantificaram de 72,9 a 76,0 mg de polifenólicos a cada 100 mL de infusões de erva-mate e comprovaram correlação da concentração de polifenólicos com a atividade antioxidante. Eles concluíram, ainda, que os ácidos orgânicos são os compostos majoritários e os flavonoides correspondem a, em média, 5,6% da composição total de polifenóis presentes na erva mate. De maneira semelhante, nos resultados da pesquisa realizada, os flavonoides correspondem a 5,9-11,9% da composição total dos polifenóis nos extratos aquosos. Entretanto, nos extratos hidroalcoólicos percebe-se elevada concentração de flavonoides em relação aos extratos aquosos, enquanto que esta diferença não se apresenta na quantificação de polifenólicos totais, lembrando que o trabalho referenciado não obteve qualquer resultado nesse sentido.

Nessa linha, Pagliosa e colaboradores (2010) quantificaram polifenólicos em extratos aquosos e metanólicos preparados com erva-mate. Os autores encontraram diferenças entre os extratos e discutem que se deve à maior solubilidade dos compostos nos álcoois e também ao fato que no extrato aquoso os polifenóis podem sofrer a ação da enzima polifenoloxidase (PFO), sendo polimerizados a quinonas. Nesse aspecto, a presente investigação identificou resultados bastante convergentes com os apontados por estes últimos autores.

5.2 Otimização do método cromatográfico

A CLAE tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência e até em órgãos governamentais (MALDANER; JARDIM, 2009).

Para a aplicação desta técnica (por qualquer analista que já não tenha um método estabelecido), um dos primeiros passos consiste em se conseguir uma condição cromatográfica adequada para avaliação do(s) componentes de interesse.

Para tanto, o desenvolvimento do método cromatográfico se constitui em uma das primeiras etapas do processo final de análise de analitos em matrizes diversas. Este procedimento inicial consiste numa complexa avaliação de múltiplos fatores que interferem simultaneamente na eficiência da separação, e podem interagir entre si. Destacam-se pH da fase móvel, concentração do modificador orgânico, fase estacionária (composição, dimensões, tamanho de partícula), inclinação do gradiente, temperatura, entre outros.

Por intermédio da otimização clássica (SNYDER; DOLAN, 1996), é possível obter bons resultados de otimização do método cromatográfico em avaliação, mas o tempo que se leva até a otimização do método é elevado, pelo fato de que os fatores são avaliados um a um e a seleção das condições ótimas depende da análise minuciosa dos cromatogramas.

A CLAE é uma técnica analítica bastante empregada, devido ao custo acessível aos principais laboratórios e à sua eficiência em comparação com as metodologias não-instrumentais. Entretanto, dependendo da matriz que se deseja analisar, efeitos de dispersão extra-coluna podem ocorrer, prejudicando a eficiência da separação. Além disso, devido às dimensões da coluna, pode ocorrer elevação no tempo de análise (FEKETE; FEKETE; GANZLER, 2009).

A CLUE é o avanço mais recente das técnicas de separação, baseia-se nos mesmos princípios da CLAE e utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 μm . O uso destas

partículas juntamente com as altas velocidades lineares da FM aumentam a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises (MALDANER; JARDIM, 2009).

Contudo, as dificuldades apontadas no início desse tópico são superadas quando o modelo de otimização fundamenta-se em parâmetros mensuráveis que podem sofrer tratamento estatístico, e se faz uso da CLUE. Neste sentido, as equações de regressão linear múltipla podem ser úteis para avaliar a influência e a interação dos fatores na modulação de uma resposta.

A sistematização do processo de otimização neste trabalho consistiu em avaliar num modelo fatorial fracionário diferentes parâmetros envolvidos na qualidade analítica dos resultados, em duas fases. A primeira, levando em conta variáveis de característica qualitativa, triando as melhores condições de fase estacionária, faixa de pH, tempo de corrida e modificador orgânico. Numa segunda etapa, após ajustados os parâmetros iniciais, variáveis de ordem quantitativa permitiram o ajuste fino do método, sendo eles: o valor específico de pH da fase móvel, temperatura da coluna, fluxo e concentração final de modificador orgânico.

Quando da realização dos experimento, na primeira fase, obteve-se após uma análise da variância entre a resposta prevista e a resposta obtida em cada corrida da fase de varredura, uma triagem dos termos a serem incluídos na equação de regressão:

$$y = b_0 + b_{24} \cdot x_2 \cdot x_4 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{133} \cdot x_1 \cdot x_3^2 + b_{234} \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{34d} \cdot x_3 \cdot x_{4d} + b_{24b} \cdot x_2 \cdot x_{4b} + b_{24c} \cdot x_2 \cdot x_{4c} + b_{224b} \cdot x_2^2 \cdot x_{4b}$$

Onde y é a resposta (número de bandas cromatográficas); b_0 é a constante da equação; b_1 é o modificador orgânico; b_2 é o tempo do gradiente; b_3 é o pH; b_{4b} é a coluna BEH C₈; b_{4c} é a coluna CSH PFP e b_{4d} é a coluna CSH fenil-hexil. As multiplicações entre os coeficientes correspondem às interações e os valores de x representam os parâmetros experimentais aplicados a cada fator.

Diferentes modelos de regressão foram testados: linear, quadrático e cúbico. O modelo de regressão cúbico foi o selecionado por apresentar o melhor coeficiente de regressão ($R = 0,9387$).

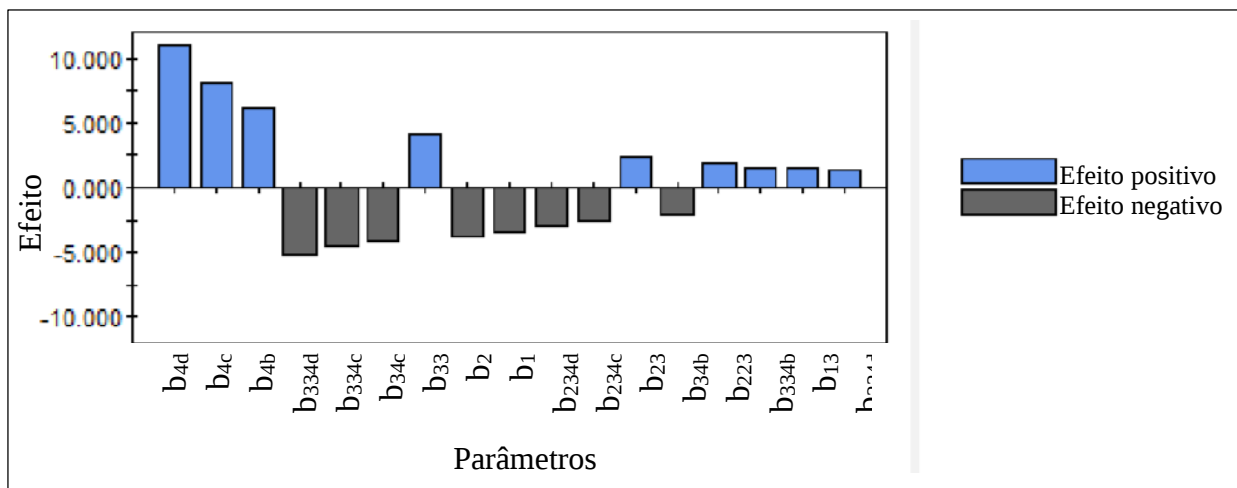


Figura 4 – Magnitude dos coeficientes da primeira equação de regressão.

Observa-se na Figura 4 a magnitude dos coeficientes da equação de regressão obtida neste estudo. A partir dos dados avaliados, pode-se concluir o quanto um efeito interfere na resposta e se essa interferência é positiva ou negativa. Percebe-se que os coeficientes que representam as diferentes fases estacionárias foram os que apresentaram maior relevância (b_{4d} , b_{4c} e b_{4b}).

Nota-se que o coeficiente b_{4d} , referente à coluna fenil-hexil, apresentou efeito positivo com maior magnitude em relação às colunas BEH C8 (b_{4b}) e CSH PFP (b_{4c}). Entretanto, esta mesma fase estacionária apresentou efeito negativo, quando se considera a interação com outros fatores, como o pH (b_{334d}).

A partir da análise estatística dos resultados dos 45 experimentos, foi possível definir a melhor combinação de parâmetros da fase de varredura: coluna BEH C₈, pH ácido, tempo de corrida de 12 minutos (incluindo o tempo de re-equilíbrio do sistema) e acetonitrila na composição da fase móvel, para a matriz analisada. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 5.

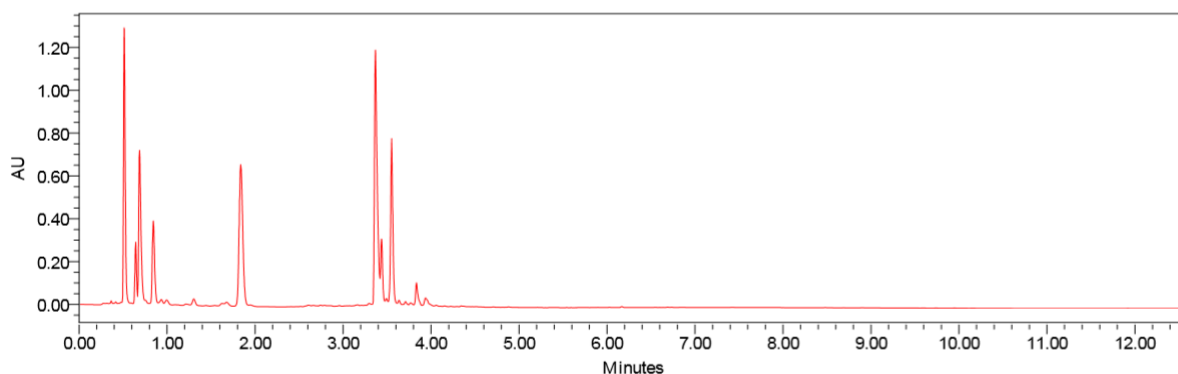


Figura 5 – Cromatograma obtido por CLUE após a primeira etapa da otimização.

Finalizada a primeira fase, após a seleção dos parâmetros relevantes, foram realizados mais outros 39 experimentos nos quais variáveis críticas para a seletividade e eficiência do método foram estudadas.

A partir dos resultados observados na segunda fase da otimização, construiu-se outra equação de regressão, desta vez considerando-se como resposta o número de picos com resolução (R_s) acima de 1,5.

O critério de inclusão dos termos consistiu na menor variância e maior significância estatística dos mesmos. A equação de regressão foi a seguinte:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_4 \cdot x_4 + b_{114} \cdot x_1^2 \cdot x_4 + b_{33} \cdot x_3^2 + b_{233} \cdot x_2 \cdot x_3^2 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2$$

Onde y é a resposta (número de bandas cromatográficas com $R_s > 1,5$); b_0 é a constante da equação; b_1 é o fluxo; b_2 é a concentração final de modificador orgânico; b_3 é a temperatura e b_4 é o pH. As multiplicações entre os coeficientes correspondem às interações e os valores de x representam os parâmetros experimentais aplicados a cada fator.

Da mesma forma que na primeira equação de regressão, o modelo cúbico foi o mais apropriado para a segunda, atingindo coeficiente de regressão (R) igual a 0,9544. Os coeficientes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aqueles que apresentaram maior significância estatística foram b_1 , b_4 e b_{33} ($p < 0,001$), indicando que são esses os principais responsáveis pela modulação da resposta y .

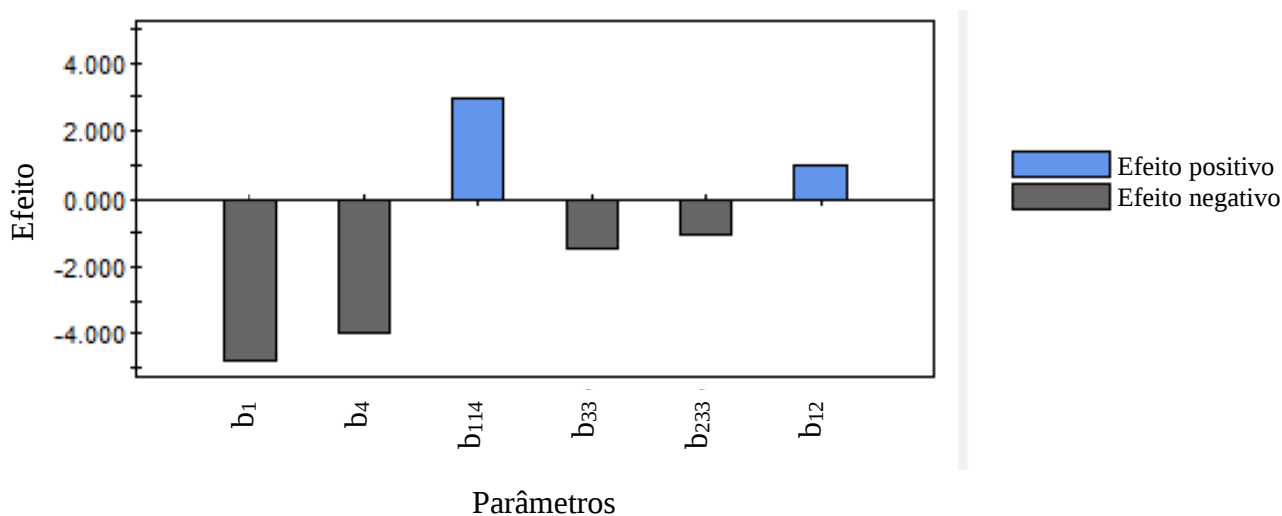


Figura 6 – Magnitude dos coeficientes da segunda equação de regressão.

A Figura 6 apresenta a magnitude dos coeficientes da equação de regressão, indicando que o fluxo (b_1) e o pH (b_4) produzem efeito negativo, isto é, à medida em que se incrementam seus valores, reduz-se o número de picos com $R_s > 1,5$ (resposta). O terceiro coeficiente estatisticamente significativo foi o coeficiente quadrático da temperatura (b_{33}), também demonstrando que temperaturas muito altas são desfavoráveis.

Uma forma de interpretar graficamente a interação entre os fatores é por intermédio de um gráfico tridimensional, chamado de superfície de resposta, que plota os fatores dois a dois, em função da resposta.

A Figura 7 demonstra o efeito negativo do fluxo e da concentração do modificador orgânico no número de picos. A maior quantidade de picos com boa resolução é obtida em condições de baixa vazão e concentrações de até 55%, que corresponde a aproximadamente 17 picos na melhor condição de fluxo e concentração final de modificador orgânico.

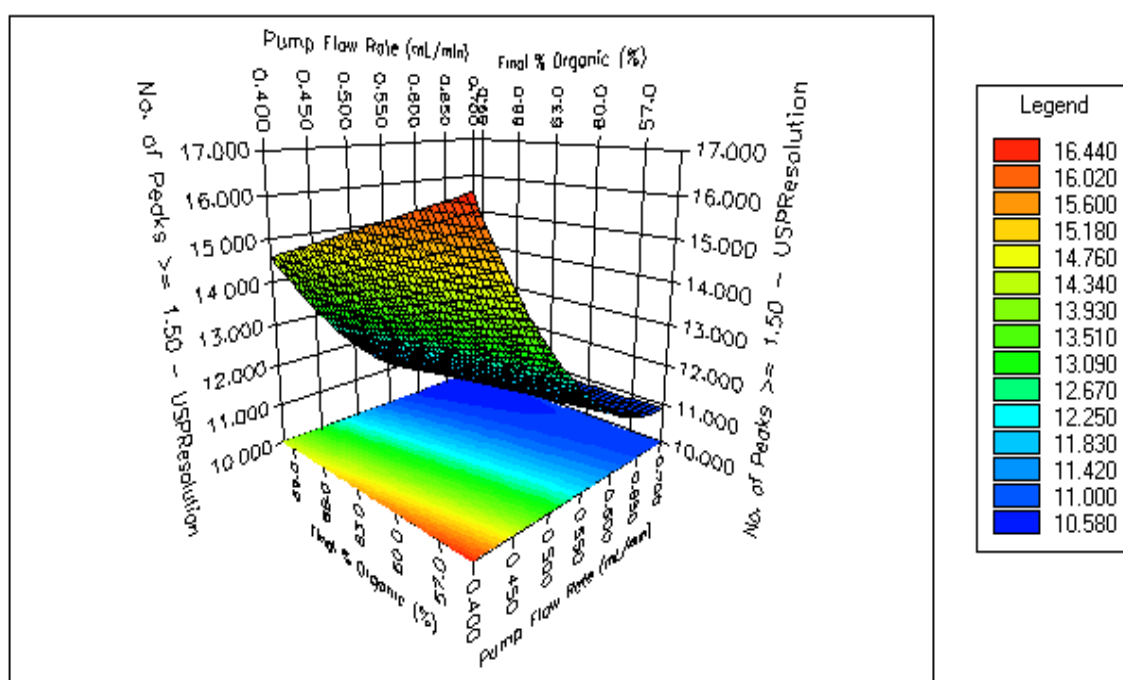


Figura 7 – Superfície de resposta envolvendo fluxo/concentração final de metanol versus número de picos com $R_s > 1,5$.

A partir do processamento estatístico da regressão linear múltipla obtida dos dados da CLUE foi possível definir a condição cromatográfica otimizada (Tabela 5) e o processamento efetuou-se no *software Fusion Method Development from S-Matrix*.

Os equipamentos de CLUE são capazes de produzir análises rápidas e eficientes, além de permitir estratégias de automatização, que minimizam a interferência do operador e, conseqüentemente, promovem melhora na reprodutibilidade. Entretanto, o elevado custo desses

cromatógrafos torna inviável a sua utilização em laboratórios de controle de qualidade de médias e pequenas empresas para aplicações rotineiras. Esse motivo justifica, nessas circunstâncias, a projeção do método para equipamentos de CLAE, que se mostra mais aplicáveis a realidade dessas empresas – que é, também, o panorama da grande maioria dos laboratórios analíticos nacionais.

Assim, a conversão dos parâmetros para a plataforma CLAE efetuou-se utilizando os softwares *Selectivity Chart* e *Acquity Columns Calculator*, cedidos pelo Laboratório de Aplicações Luís Barssoti, da Waters do Brasil (São Paulo, SP), objetivando aplicar os resultados de otimização obtidos na rotina do laboratório de análises utilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

O solvente disponível no momento da execução das análises na CLAE era o metanol. Desta forma, o método otimizado foi testado utilizando-se esta FM para a obtenção dos *fingerprints*, obtendo-se ótimos resultados e padronizando-se o metanol como solvente forte. Visualiza-se aqui que o planejamento fatorial é importante para a seleção das condições ótimas, mas que o resultado pode ser adaptado à realidade do equipamento e/ou do laboratório.

Tabela 5 – Condição cromatográfica obtida pelo estudo fatorial nas plataformas CLUE e CLAE.

Parâmetros		Plataforma CLUE	Plataforma CLAE
Coluna	Tipo	BEH C ₈	XBridge C ₈
	Dimensão	50 x 2.1 mm, 1.7 µm	75 x 4.6 mm, 2.5 µm
Fase móvel		Acetonitrila (B) e água ultrapura em pH = 2.17 (ácido fórmico) (A)	Metanol (B) e água ultrapura em pH = 2.17 (ácido fórmico) (A)
Fluxo		0.4 mL/min	1.3 mL/min
Temperatura	Coluna	33 °C	33 °C
	Autoinjeter	10 °C	10 °C
Volume de injeção		1 µL	10 µL

A figura 8 apresenta o *fingerprint* de um extrato de erva-mate obtido através do método desenvolvido (CLUE).

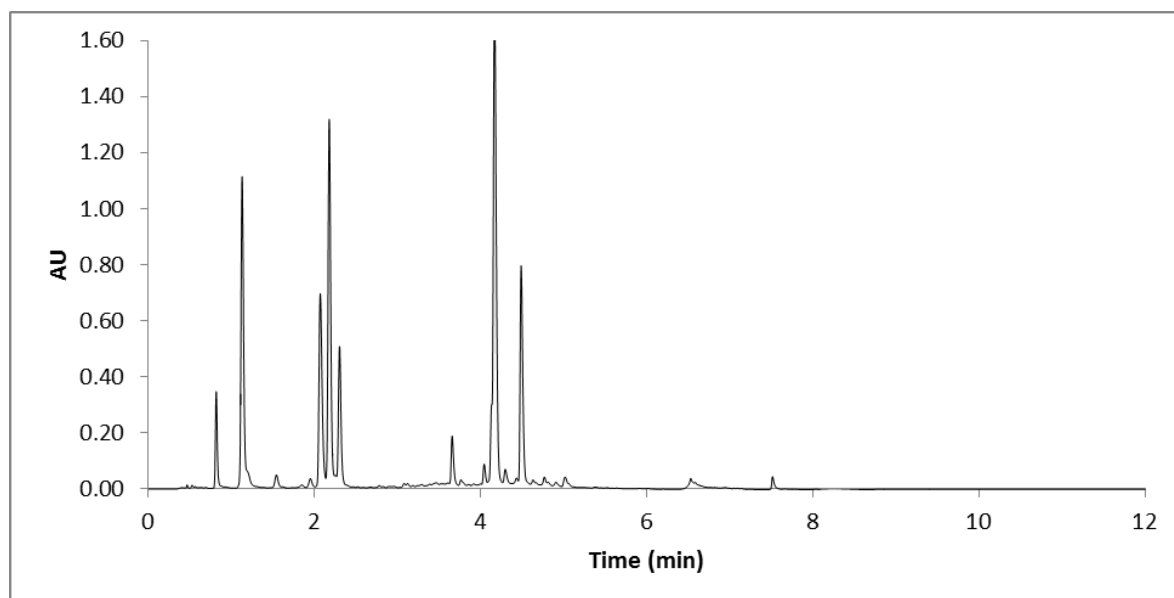


Figura 8 – *Fingerprint* de erva-mate obtido por CLUE após a otimização do método.

Deste cromatograma constata-se um bom número de picos com excelente resolução, sendo esses resultados esperados para a análise de um extrato bruto. O método desenvolvido foi aplicado usando-se CLAE para a análise das sete amostras em estudo, conforme se observa na Figura 9.

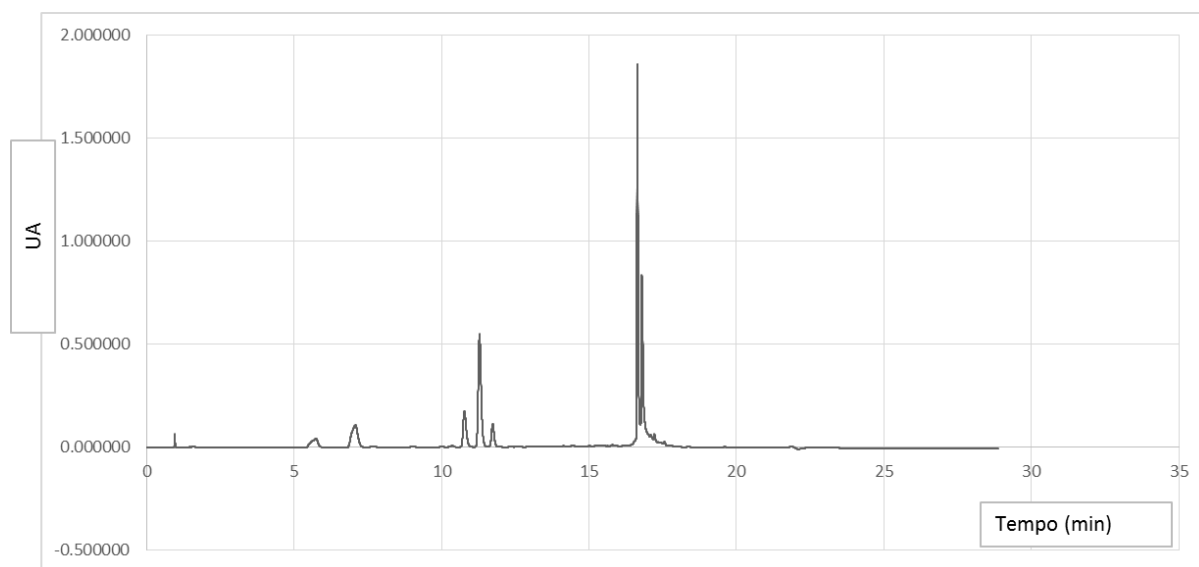


Figura 9 – *Fingerprint* de erva-mate obtido por CLAE. Condições cromatográficas: coluna XBridge C8 75 x 4.6 mm/2.5 μ m; fase móvel: MeOH (B) e água ultrapura (A); vazão 1,0 mL/min; temperatura da coluna 33 $^{\circ}$ C; gradiente: 0-5 %B em 2,62 min; 5-32,5 %B em 12,13 min; 32,5-90 %B em 1,66 min; 90 %B por 4,86 min; 90-5 %B em 7,61 min.

No mesmo sentido deste trabalho, Ji e colaboradores (2005) desenvolveram um estudo fatorial em quatro passos para a seleção de parâmetros cromatográficos, determinação das condições ótimas e validação do método para a obtenção de *fingerprints* por CLAE de extratos

de *Ginkgo biloba*. Os autores obtiveram rapidamente bons resultados e sugerem que esta estratégia pode ser utilizada para o controle de qualidade de outras espécies vegetais.

Alaerts e colaboradores (2007) executaram um estudo para a obtenção, através da CLAE, de *fingerprints* de quatro espécies vegetais. Foi conduzida uma primeira etapa de varredura ou *screening*, para determinar a melhor característica de fase móvel para cada amostra. Em seguida, na etapa de otimização, foram ajustados o fluxo, comprimento da coluna, inclinação do gradiente e comprimento de onda. De forma semelhante a esse trabalho, a otimização foi sistematizada avaliando numa primeira etapa as variáveis de característica qualitativa; numa segunda etapa, realizou-se o ajuste fino do método, determinando os parâmetros de característica quantitativa.

5.3 Validação e análise quantitativa

A quantificação de marcadores químicos é um importante parâmetro de avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais, como pode-se observar em diversas monografias de espécies vegetais contidas na Farmacopeia Brasileira.

A seleção das substâncias químicas empregadas como marcadores químicos de uma espécie vegetal, normalmente está associada à identificação de um grupo de metabólitos secundários, comumente presentes na erva-mate. Em outros casos, avalia-se alguma substância em especial que pode estar relacionada à atividade farmacológica desta espécie (marcador ativo) ou seja apenas uma substância que garanta a importância econômica do produto em questão (marcador analítico) (EFFERTH; GRETEN, 2012).

Para este trabalho, três substâncias foram selecionadas como marcadores químicos: cafeína, teobromina e ácido clorogênico. As duas primeiras (Figura 10) pertencem à classe das metilxantinas, que são pseudoalcaloides derivados da purina, responsáveis pela atividade estimulante atribuída à erva-mate e também impactantes no valor econômico do vegetal (BRACESCO et al., 2010). Já o ácido clorogênico é um ácido orgânico polifenólico derivado da esterificação de ácidos *trans*-cinâmicos (ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico) com o ácido quínico. É dotado de atividade antioxidante importante na proteção contra o stress oxidativo e doenças cardiovasculares, neoplásicas e neurodegenerativas (BELAY; GHOLAP, 2009). Esta ação farmacológica, atribuída ao extrato da erva-mate, é a buscada pelas pessoas quando do uso da planta nas mais diversas formas de apresentação.

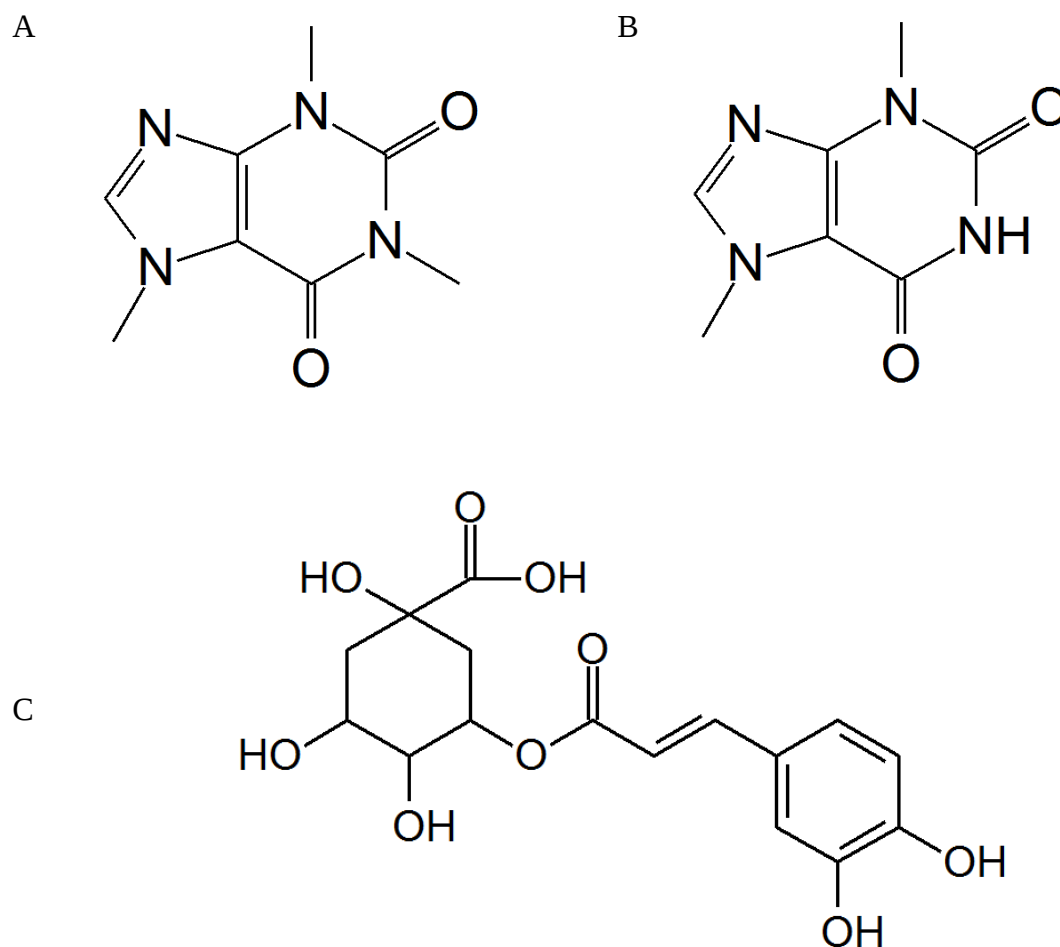


Figura 10 – Marcadores químicos selecionados para a quantificação na erva-mate. A) Cafeína; B) Teobromina; C) Ácido clorogênico.

Neste contexto, como a erva-mate é usada comumente na forma de chimarrão e os extratos do vegetal são empregados como matéria prima para o preparo dos mais diversos produtos farmacêuticos, cosméticos e nutracêuticos, se faz necessário realizar a determinação qualitativa e quantitativa dos principais marcadores químicos desta espécie.

Ressalta-se ainda a importância de que todo método analítico qualitativo ou quantitativo precisa ser validado, para que se demonstre que o mesmo é apropriado para atender a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa e/ou quantitativa dos marcadores químicos.

O método analítico desenvolvido foi validado. As curvas de calibração obtidas para os três marcadores apresentaram coeficiente de regressão linear (r^2) superior a 0,999, demonstrando a presença de linearidade na relação entre a área do pico e concentração do analito dentro do intervalo de concentração proposto. As curvas de calibração podem ser observadas nas Figuras 11, 12 e 13.

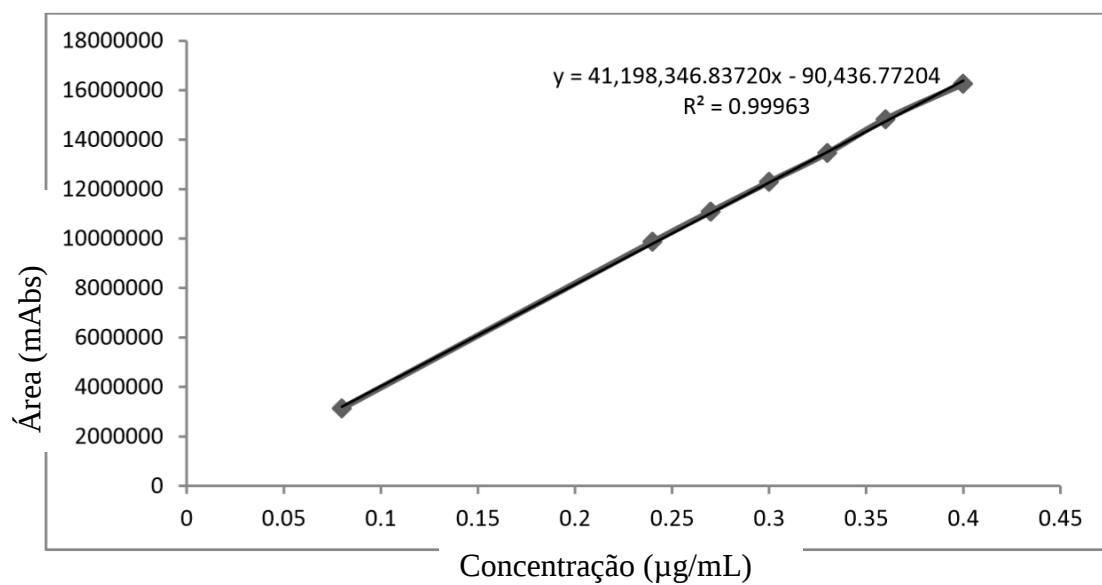


Figura 11 – Curva de calibração da cafeína

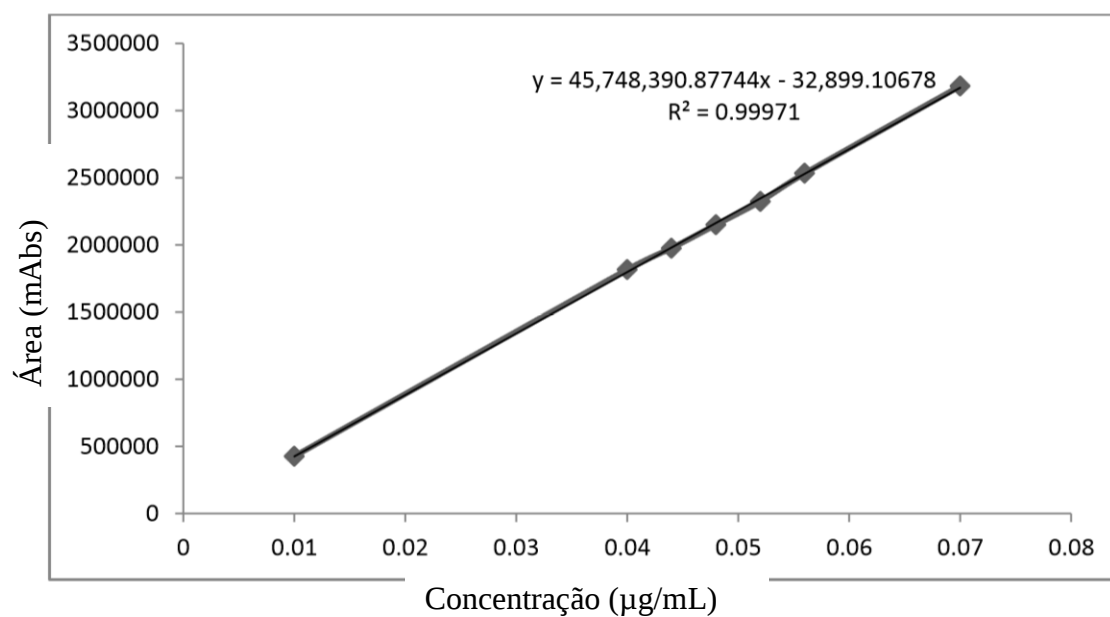


Figura 12 – Curva de calibração da teobromina.

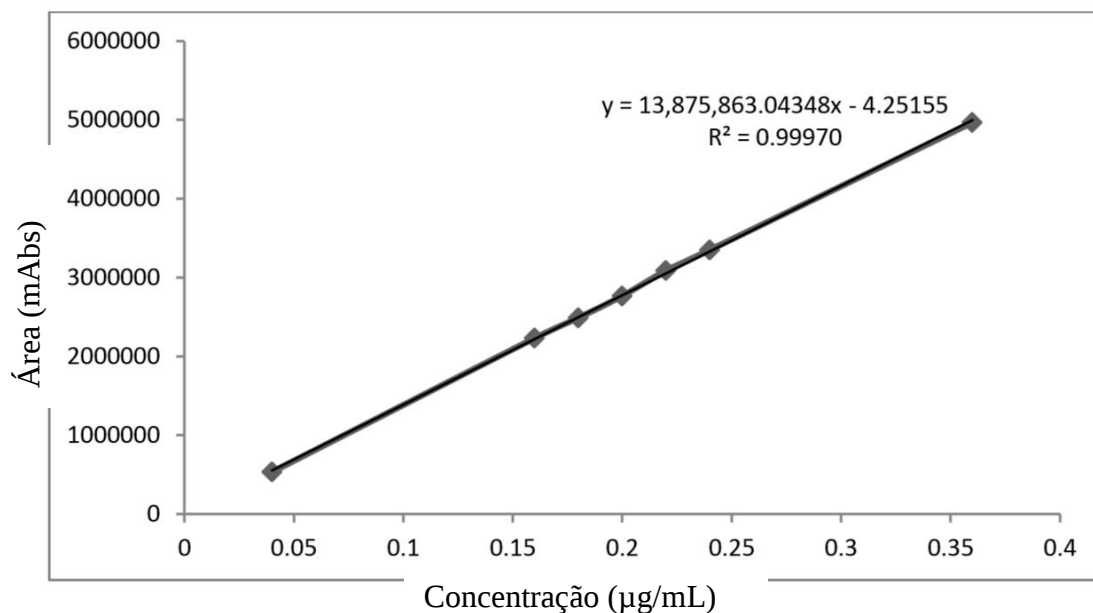


Figura 13 – Curva de calibração do ácido clorogênico

Um exemplo de cromatograma típico da etapa de validação pode ser observado na Figura 14.

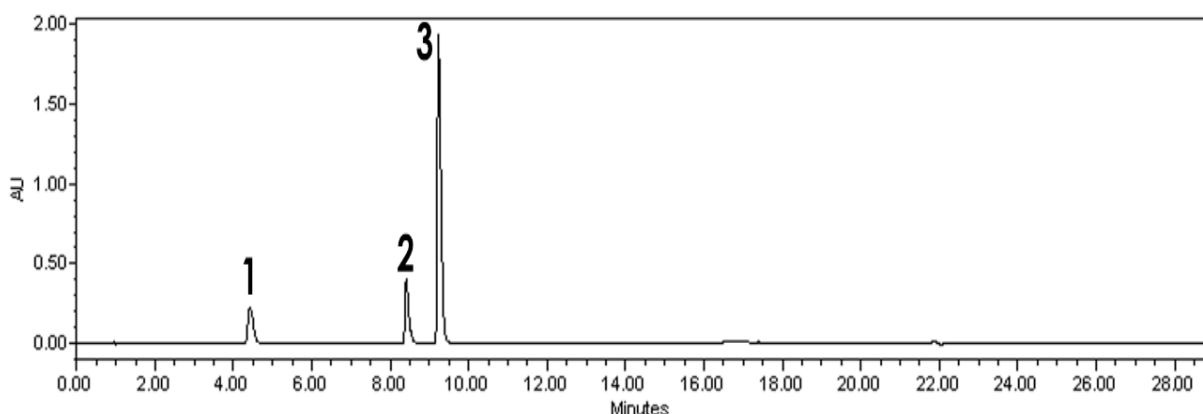


Figura 14 – Cromatograma dos padrões primários de 1) teobromina; 2) ácido clorogênico; 3) cafeína.

A seletividade da cafeína, teobromina e ácido clorogênico foram examinadas comparando o espectro do arranjo de fotodiodos e os fatores de retenção dessas substâncias nas corridas analíticas e nas injeções dos padrões comerciais. Uma vez que não foram encontrados elementos co-eluídos nas bandas dos três marcadores, o método foi considerado adequado para a quantificação dos mesmos. Os parâmetros de equação da reta, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, e recuperação estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de validação da teobromina, ácido clorogênico e cafeína.

Parâmetro		Teobromina	Ácido clorogênico	Cafeína
Fator de retenção (k)		4,67	8,93	9,81
Linearidade	Equação da reta	$y=45.748.390,88 x - 32.899,10$	$y=13.875.863,04 x - 4,20$	$y = 41.198.346,84 x - 90.436,70$
	r^2	0,99971	0,99970	0,99963
Precisão intradia	Exatidão (%)	101,40	102,10	101,30
	CV (%)	0,58	0,36	0,68
Precisão interdia	Exatidão (%)	101,83	102,08	100,27
	CV (%)	1,31	0,69	1,12
LID (µg/mL)		0,1	0,1	0,03
LIQ (µg/mL)		0,5	0,5	0,04
Recuperação (%)		98,900	98,250	96,520

Os valores de precisão foram expressos em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as triplicatas de injeção. Para a teobromina, foram obtidos valores de CV% entre 0,17 e 3,17%, e as exatidões mantiveram-se no intervalo de 101,0 a 103,2%; para o ácido clorogênico, foi encontrado o intervalo de 0,18-2,54% de CV% e as exatidões mantiveram-se no intervalo de 98,9-104,9%; para a cafeína, os valores de CV% permaneceram entre 0,41 e 3,63%. Esses resultados são aceitáveis, uma vez que o CV% não ultrapassa 5% em nenhum dos grupos de triplicatas (BRASIL, 2003).

O limite de inferior de detecção (LID) foi determinado pela relação sinal-ruído, onde a área da banda cromatográfica encontrada para a FM nos tempos de retenção dos marcadores foi comparada com a área das bandas cromatográficas dos padrões externos. O LID foi determinado quando a razão entre essas áreas é igual a 3 (três), sendo 0,1 µg/mL para a teobromina, 0,1 µg/mL para o ácido clorogênico e 0,03 µg/mL para a cafeína. Observa-se que quantidades muito pequenas destes marcadores químicos pode ser detectada pelo método cromatográfico.

O limite inferior de quantificação (LIQ) também foi determinado pela relação sinal-ruído, segundo o mesmo procedimento da determinação do LID. Contudo, neste caso os valores de LIQ são encontrados quando a razão entre as áreas da FM e do padrão externo é igual a 10 (dez). Foram determinados valores de LIQ de 0,05 µg/mL para a teobromina (CV% não ultrapassou 2,49%), 0,5 µg/mL para o ácido clorogênico (CV% não ultrapassou 3,32%) e 0,04 µg/mL para a cafeína (CV% não ultrapassou 1,96%).

Neste método, as amostras não necessitaram de nenhum pré-tratamento prévio à injeção no cromatógrafo além da filtração. Desta forma, a recuperação foi avaliada no sentido de determinar a perda de amostra durante a passagem das mesmas pelos microfiltros de 0,22 µm. Os valores acima de 96% encontrados para os três marcadores são considerados aceitáveis.

A estabilidade no auto-injetor foi avaliada mantendo-se as amostras armazenadas por sete dias no carrossel de amostras do cromatógrafo. As amostras foram injetadas e os valores de exatidão não ultrapassaram a variação de 5% para nenhum dos marcadores.

A robustez do método analítico define o impacto de pequenas variações no funcionamento do equipamento nos resultados da análise. Foram avaliadas condições de temperatura de 2 °C para mais e para menos, obtendo-se valores de CV% de 0,17-1,86 % para a teobromina; 0,05-0,52% para o ácido clorogênico; e 1,49-1,95% para a cafeína.

Percebe-se a partir dos dados relatados que todos os critérios da RE nº 899/2003 (ANVISA) foram atendidos. Entretanto, para elevar-se ainda mais a confiabilidade da curva analítica, sugere-se que além do coeficiente de regressão linear sejam levados em conta outros

parâmetros estatísticos (PASSAGLI, 2011). Portanto, efetuou-se a análise dos resíduos para as três curvas analíticas (Figuras 15, 16 e 17).

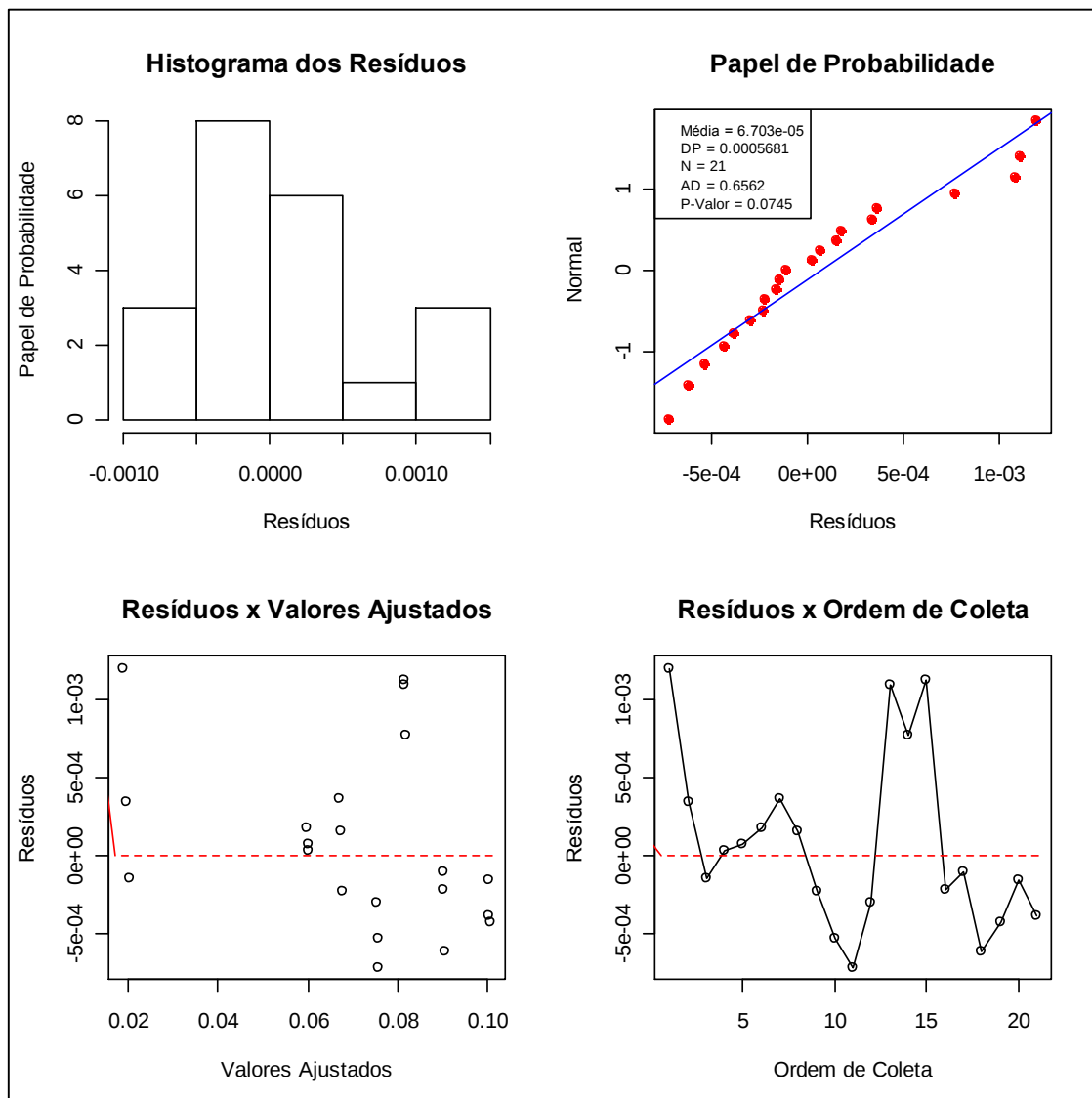


Figura 15 – Análise de resíduos da curva analítica da cafeína.

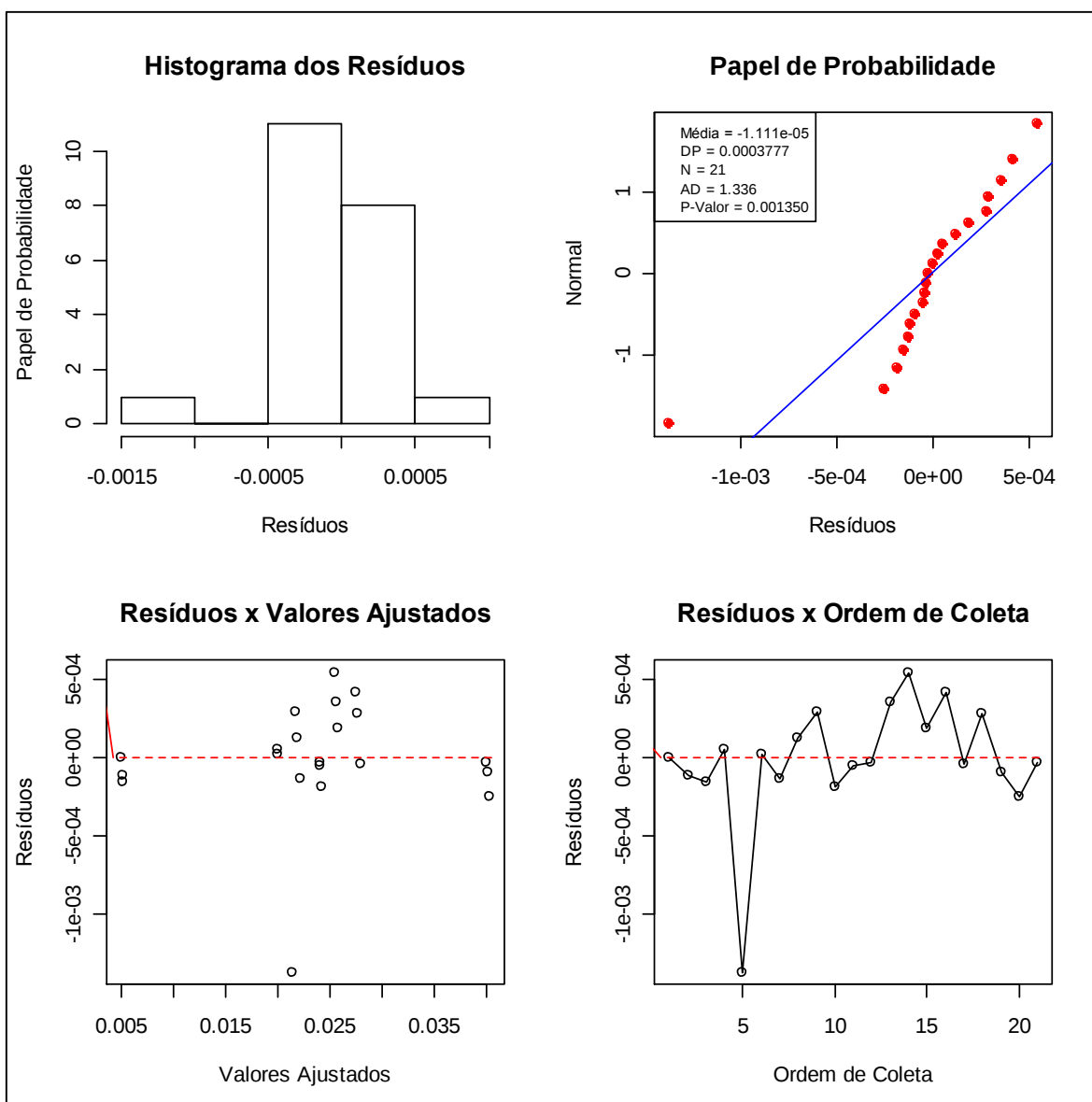


Figura 16 – Análise de resíduos da curva analítica da teobromina.

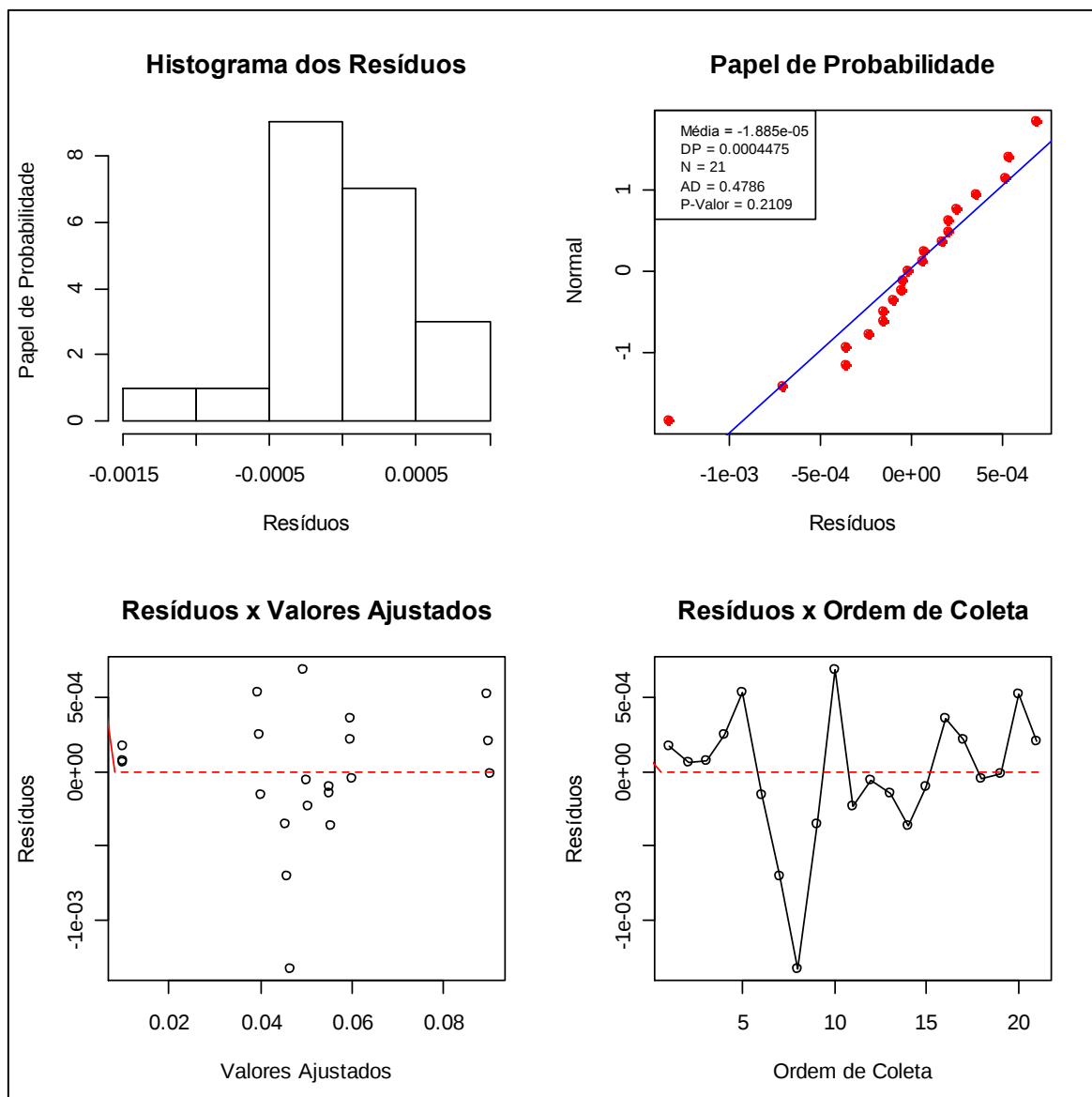


Figura 17 – Análise de resíduos da curva analítica do ácido clorogênico.

Observa-se que a magnitude dos resíduos é muito pequena, para os três marcadores. Nos três casos o modelo ajustado apresentou r^2 acima de 0,999, muito similar ao valor obtido nas curvas originais. Esses resultados indicam que nas três curvas não foram detectados problemas como falta de ajuste e desvios de linearidade (RIBEIRO et al., 2008).

A interferência da matriz foi avaliada através de curvas de calibração com adição de padrão (Figuras 18, 19 e 20).

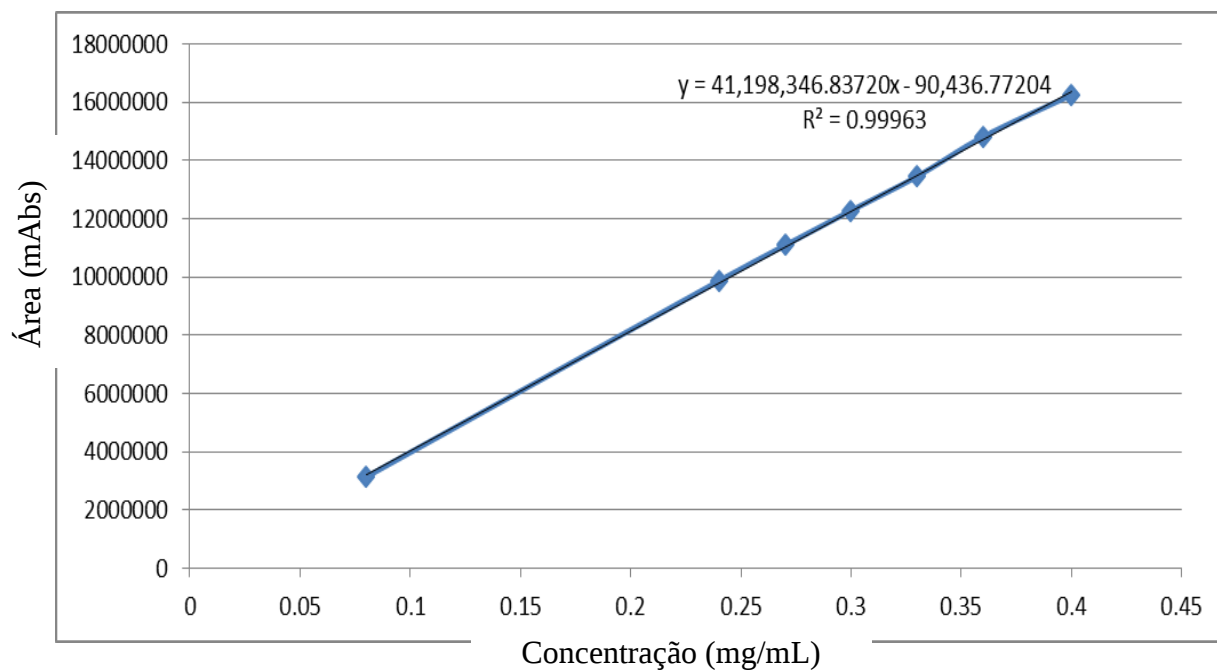


Figura 18 – Curva de adição de padrão da cafeína.

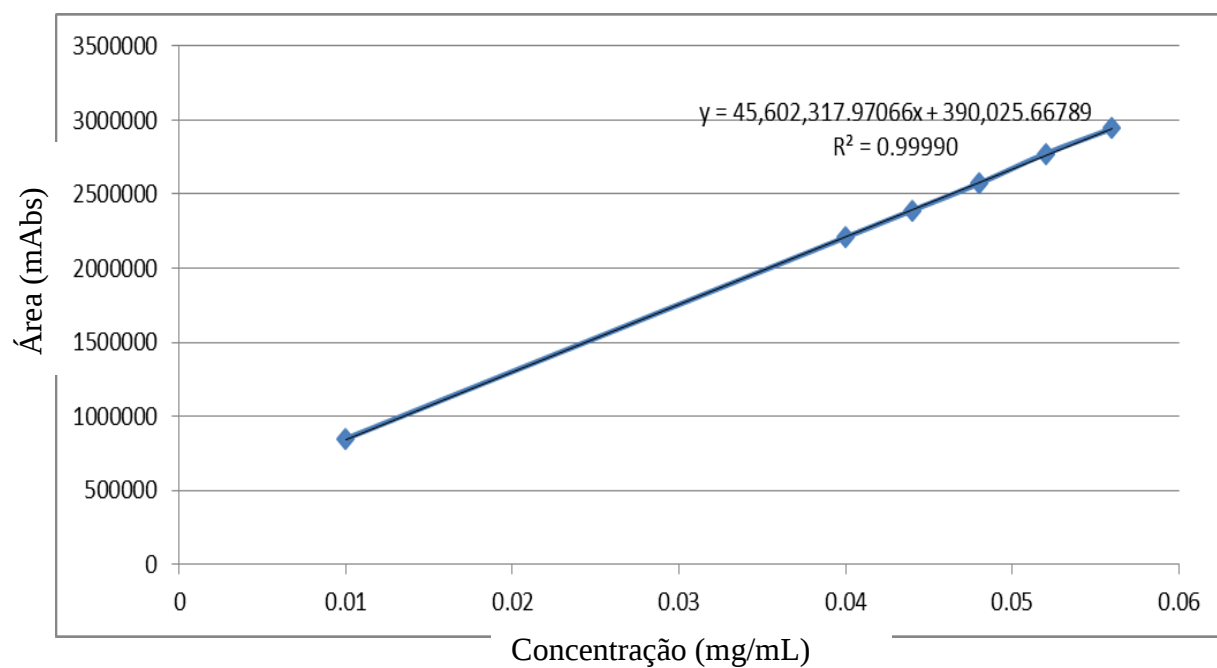


Figura 19 – Curva de adição de padrão da teobromina.

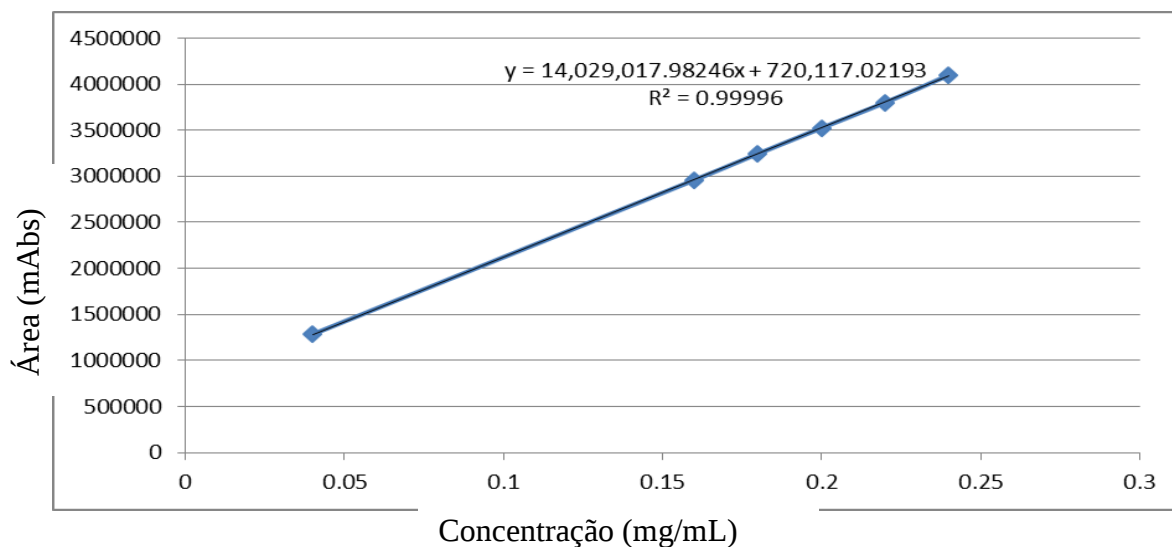


Figura 20 – Curva de adição de padrão do ácido clorogênico.

As curvas apresentaram-se lineares ($y = 45.602.317,97 x + 390.025,67$ e $r^2 = 0,99990$ para teobromina; $y = 14.029.017,98 x + 720.117,02$ e $r^2 = 0,99996$ para o ácido clorogênico e $y = 41.839.983,75 x + 2.016.216,86$ e $r^2 = 0,99879$ para a cafeína) e o paralelismo e concordância entre as duas curvas foi observado, permitindo-se inferir que a matriz não interfere na análise dos marcadores químicos (BELTRAME et al., 2006).

O método validado foi capaz de quantificar eficientemente ácido clorogênico, cafeína e teobromina em extratos de erva-mate. Foram analisadas sete matérias-primas diferentes adquiridas no comércio de Ponta Grossa – PR e os resultados da quantificação estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da quantificação de teobromina, ácido clorogênico e cafeína nas amostras comerciais.

Amostra	Teobromina		Ácido clorogênico		Cafeína	
	A	H	A	H	A	H
Amostra 1	6,57	56,52	90,85	349,43	67,55	255,03
Amostra 2	14,33	58,96	110,42	388,15	70,56	312,12
Amostra 3	11,44	50,32	94,26	337,87	67,09	327,05
Amostra 4	11,60	46,16	72,89	341,29	51,16	211,80
Amostra 5	11,16	45,88	101,45	360,67	92,70	349,19
Amostra 6	12,90	51,33	94,97	305,90	61,18	237,72
Amostra 7	12,02	46,70	95,71	327,35	62,51	255,91

NOTA: A = extrato aquoso; B = extrato hidroalcoólico. Resultados expressos em mg por 100 gramas de vegetal.

Observa-se que para os três marcadores é encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon não pareado) entre os extratos aquosos e hidroalcoólicos. Essa diferença deve-se a duas razões principais: a primeira delas é que a quantidade de biomassa vegetal empregada na preparação dos extratos aquosos foi quatro vezes menor do que dos extratos hidroalcoólicos. Em segundo lugar, diferenças na solubilidade dos compostos em relação ao solvente extrator exercem influência no teor dos marcadores, como já observado nos resultados de quantificação de flavonoides totais e polifenólicos totais por espectrofotometria (Seção 5.1). Além disso, é sabido que as xantinas apresentam baixa solubilidade em água, sobretudo a teobromina (ROTH et al., 1991).

Outra característica interessante em relação a esses resultados é que o extrato hidroalcoólico da amostra 5 apresentou o maior teor de cafeína entre as amostras (349,19 mg), em contraste com o menor teor de teobromina (45,88 mg). Tal fenômeno é mais evidente na amostra 5, mas se justifica para as demais, pelo fato de que ambas as xantinas são provenientes da mesma via biossintética, de forma que a produção de uma pode comprometer a síntese da outra (SIMÕES et al., 2007).

Outros estudos já quantificaram polifenólicos e xantinas em erva-mate. Gnoatto et al. (2007) concluíram em seu estudo que o método de extração influencia no conteúdo de metilxantinas em *Ilex paraguariensis*, variando a razão cafeína/teobromina de 1,4 a 14,0. Em nosso estudo, de maneira similar, a razão cafeína/teobromina varia de 4,8 a 10,3.

Pagliosa et al. (2010) detectaram 0,86 g de cafeína e 0,15 gramas de teobromina por 100 gramas de folhas secas, sendo a razão cafeína/teobromina 5,7. Os mesmos autores detectaram o ácido clorogênico na concentração de 0,14 gramas por 100 gramas de folhas secas.

Através de cromatografia líquida e utilizando uma coluna de núcleo fundido, Rostagno e colaboradores (2011) quantificaram cafeína e compostos fenólicos em bebidas estimulantes. Foram encontrados para o chá mate 134 mg/L de ácido clorogênico e 40 mg/L de cafeína. Além destes, foram encontrados em menor concentração o ácido cafeico, quercetina e kaempferol.

Cansian (2003) encontrou quantificações entre 43,13 até 334,93 mg de cafeína por grama de extrato utilizando CG acoplada à EM em 20 diferentes populações de *Ilex paraguariensis*. Para a teobromina, o mesmo autor encontrou valores entre 0,04 e 0,39 mg/g de extrato. Esses resultados demonstram a variabilidade na composição química decorrente da região de cultivo da erva, observação também realizada neste trabalho.

5.4 Quimiometria

Em alguns casos, a determinação quantitativa de alguns componentes não é suficiente para determinar a totalidade da composição química do vegetal. Assim sendo, a análise multivariada quimiométrica dos *fingerprints* pode aprimorar as abordagens de controle de qualidade de materiais vegetais (GOMES, 2009).

Os cromatogramas *fingerprint* obtidos por CLAE a 280 nm para os extratos de diferentes amostras comerciais de erva-mate estão apresentados nas Figuras 21 e 22. É possível observar visualmente nos cromatogramas uma grande similaridade entre as amostras, mas não podem ser inferidas informações conclusivas sobre as reais diferenças existentes entre elas, ou se estas tratam-se realmente de amostras de erva-mate.

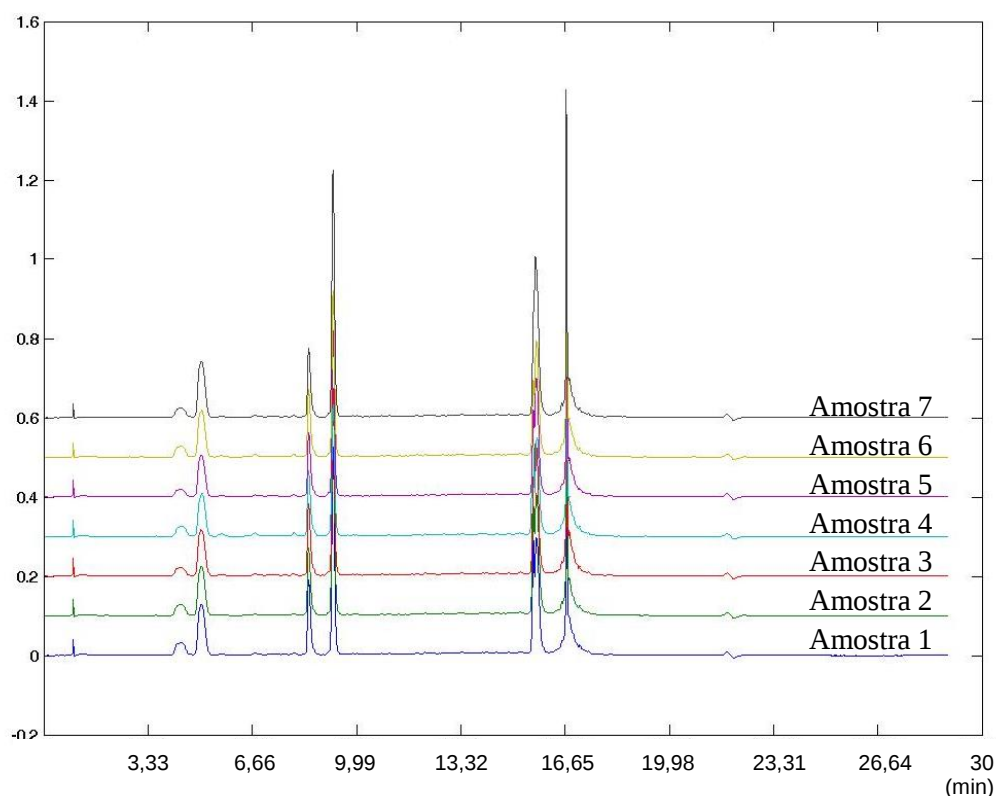


Figura 21 - *Fingerprints* obtidos dos extratos hidroalcoólicos (H) de erva-mate.

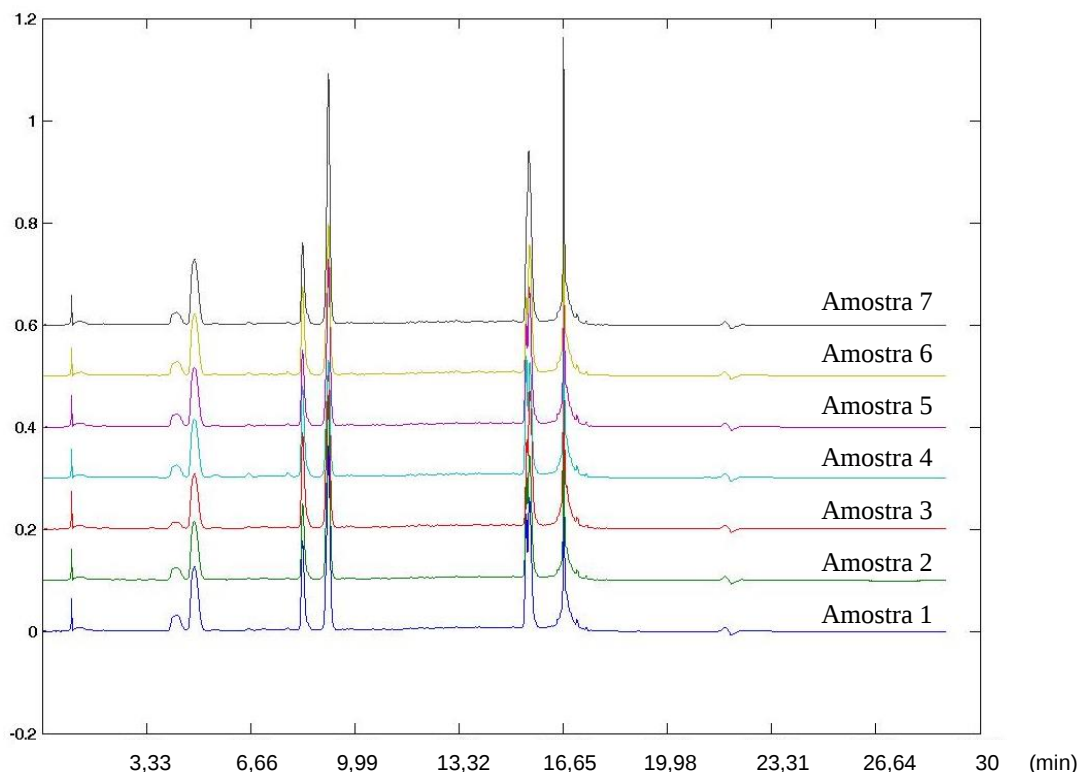


Figura 22 – *Fingerprints* obtidos dos extratos aquosos (A) de erva-mate.

Para a exploração dos dados químicos provenientes da análise cromatográfica, foram aplicadas aos dados cromatográficos a análise de componentes principais (ACP) e a análise de agrupamento hierárquico (AAH).

Os resultados da ACP demonstraram que para os extratos hidroalcoólicos o primeiro componente (PC1) explicou 98,56% da variabilidade, enquanto que o segundo (PC2) e o terceiro (PC3) componentes explicaram 0,82% e 0,41% da variabilidade, respectivamente. Da mesma forma, para os extratos aquosos, PC1 explicou 99,05% da variabilidade, enquanto que PC2 e PC3 explicaram 0,57% e 0,21%, respectivamente.

Em ambos os casos, os três primeiros componentes foram capazes de explicar mais de 99% da variabilidade dos dados experimentais. A Figura 23 demonstra que a análise quimiométrica dos cromatogramas obtidos dos extratos hidroalcoólicos classificou as amostras em três grupos distintos. No mesmo sentido, para os extratos aquosos, também foi possível se classificar as diferentes amostras em três grupos (Figura 24).

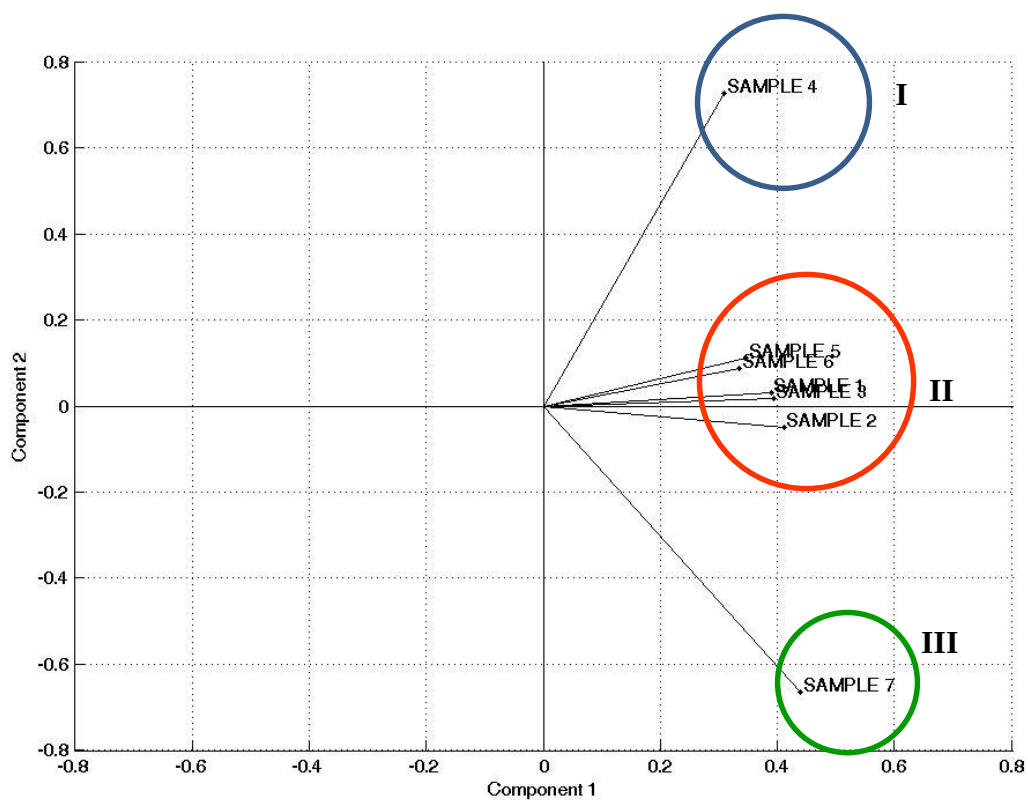


Figura 23 – ACP dos *fingerprints* dos extratos hidroalcoólicos (H) de erva-mate.

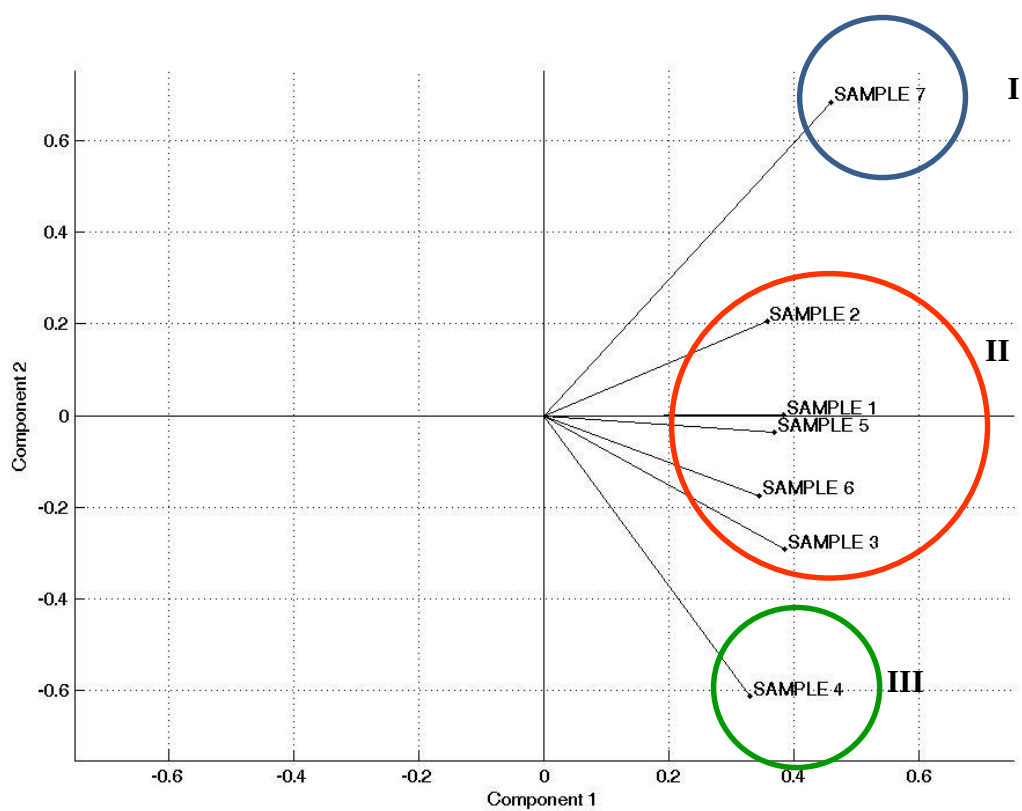


Figura 24 – ACP dos *fingerprints* dos extratos aquosos (A) de erva-mate.

Em ambos os casos (extratos aquoso e hidroalcoólico), as amostras 4 e 7 classificaram-se de forma isolada em grupos distintos e as demais amostras agruparam em um único bloco separadamente, indicando que estas apresentam características químicas semelhantes entre si e diferentes das amostras 4 e 7.

Para verificar o grau de similaridade entre as amostras e corroborar os dados da ACP foi aplicada a AAH. Esta foi desenvolvida com aproximadamente 30% de similaridade para os extratos hidroalcoólico e aquoso (Figuras 25 e 26). Os resultados permitem determinar que a amostra 7 classifica-se diferentemente das demais amostras quando analisados os dados dos cromatogramas dos dois tipos de extratos.

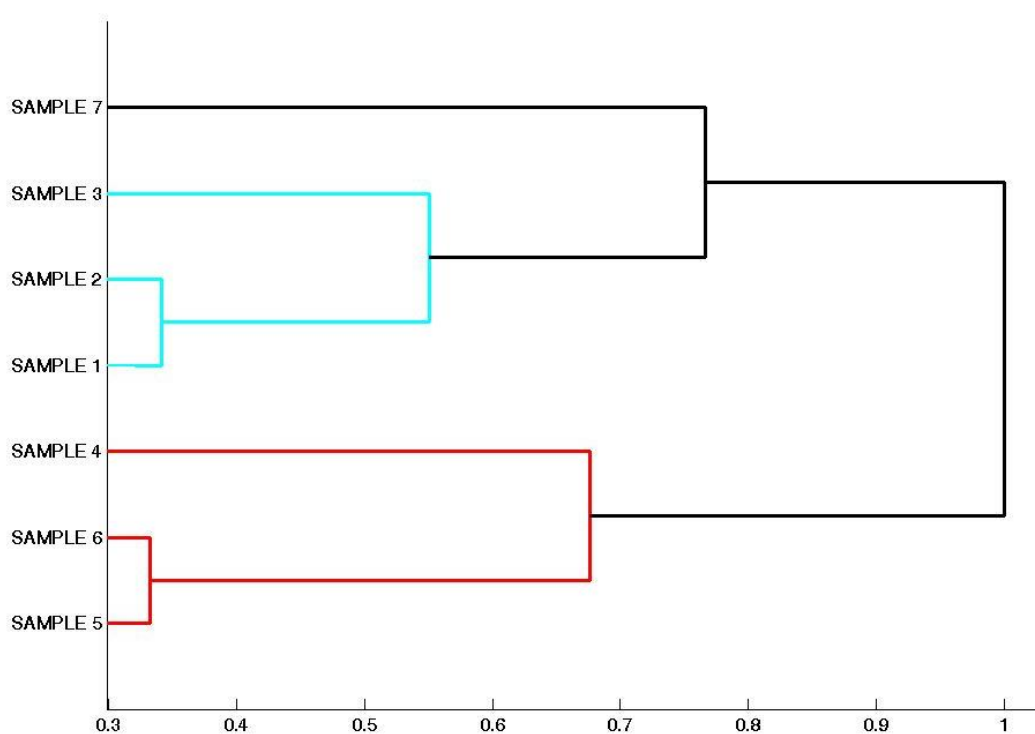


Figura 25 – AAH dos *fingerprints* dos extratos hidroalcoólicos de erva-mate

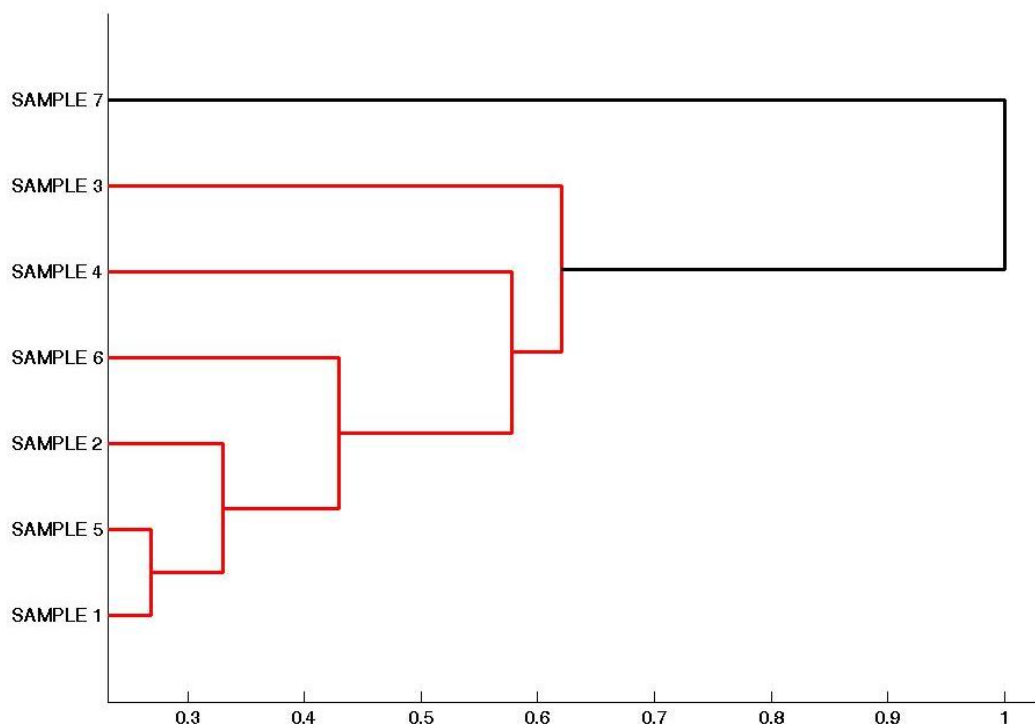


Figura 26 – AAH dos *fingerprints* dos extratos aquosos de erva-mate.

Os resultados da AAH corroboram os resultados da ACP no sentido de que a amostra 7 está distante das demais. É possível identificar algumas razões para o dado encontrado: a amostra 7 é a única cultivada fora do Estado do Paraná, embora seja comercializada na região. Sabe-se que fatores edáficos estão relacionados à região de cultivo e podem interferir significativamente na produção de metabólitos secundários pelo vegetal (FREIRE, 2004).

As demais distinções observadas entre as amostras podem ser geradas por diferenças no processamento e/ou armazenamento do vegetal. A estabilidade de muitas substâncias está condicionada à prevenção contra a exposição ao calor excessivo (ISOLABELLA et al., 2010). Como o processamento da erva para a obtenção do chimarrão envolve temperaturas relativamente elevadas, o tempo de secagem ou o sapeco podem ser etapas interferentes para a caracterização química da matéria-prima.

Por outro lado, quando a ACP e a AAH foram aplicadas à totalidade de extratos obtidos (aquosos e hidroalcoólicos), os resultados puderam demonstrar claramente as diferenças intrínsecas entre os dois grupos (Figuras 27 e 28).

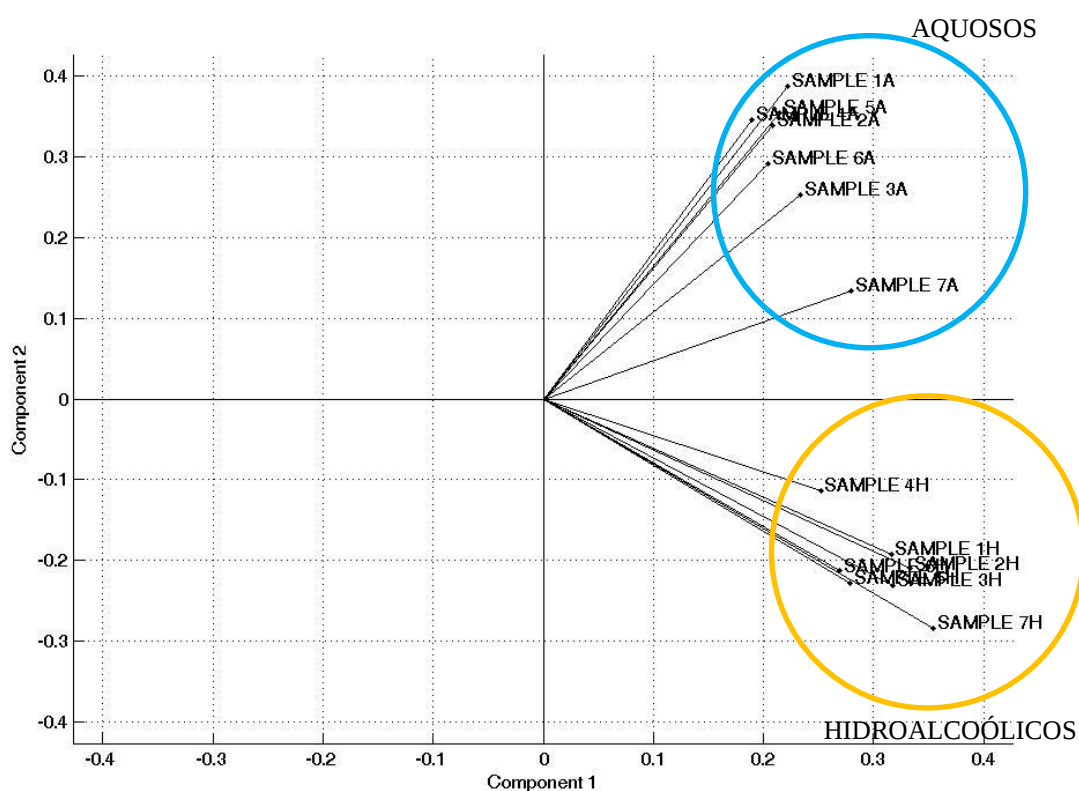


Figura 27 – ACP dos *fingerprints* dos extratos aquosos (A) e hidroalcoólicos (H) de erva-mate.

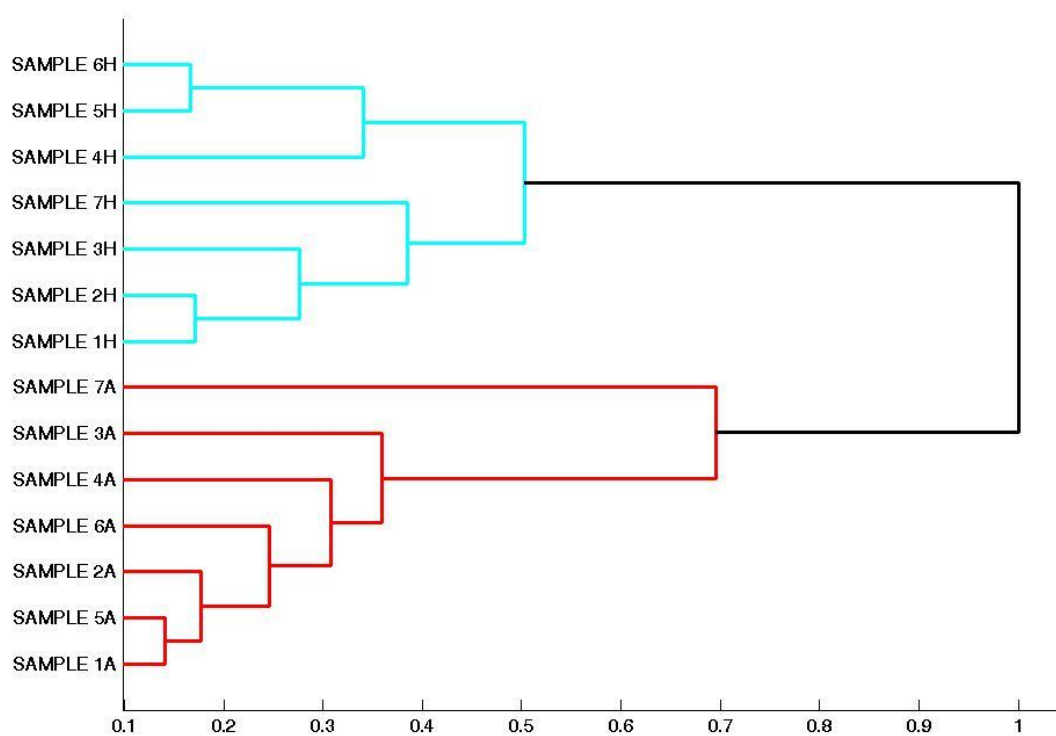


Figura 28 – AAH dos *fingerprints* dos extratos aquosos (A) e hidroalcoólicos (H) de erva-mate.

A diferença entre os grupos A e H deve-se à afinidade química de muitos constituintes com os solventes usados para o preparo dos extratos, que variam de acordo com a polaridade das substâncias. O método de extração causa variações qualitativas e quantitativas nas amostras, que levam a classificações distintas na quimiometria (ISOLABELLA et al., 2010).

A quimiometria é uma importante ferramenta para classificar e identificar amostras baseando-se em diferenças química, neste caso o perfil cromatográfico. Vários outros estudos obtiveram resultados semelhantes, quando do uso de métodos instrumentais associados à estatística multivariada.

Van der Kooy e colaboradores (2009) aplicaram ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) associadas à análise multivariada para o controle de qualidade de materiais vegetais e fitofarmacêuticos, e os autores enxergam perspectivas futuras para o desenvolvimento dessas técnicas.

Martins, Pereira-Filho & Cass (2011) analisaram o perfil cromatográfico de seis espécies do gênero *Phyllanthus* e através do uso de modelos quimiométricos foi possível classificar e autenticar 25 amostras comerciais.

Ainda, Kim e colaboradores (2010) usaram RMN e quimiometria para classificar onze espécies sul-americanas do gênero *Ilex* e mostraram claramente que a discriminação metabolômica permite a classificação quimiotaxonômica das amostras. Neste estudo, os autores concluíram que o grupo de espécies na qual se encaixa *Ilex paraguariensis* apresenta em sua composição grande concentração de xantinas e polifenólicos (fenilpropanoides e flavonoides), em consonância com os resultados deste trabalho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a eficiência da cromatografia na avaliação de matrizes complexas, como os extratos de produtos naturais.

A otimização do método cromatográfico pode seguir o modelo clássico, pelo qual o analista define as melhores variáveis a serem estudadas e a melhor condição cromatográfica de análise. Contudo, a abordagem *Quality by Design* apresenta diversas vantagens sobre aquele modelo, tais, como, por exemplo, a economia de tempo e a possibilidade de avaliação de múltiplas variáveis simultaneamente.

O método desenvolvido foi útil para a obtenção do *fingerprint* da erva-mate e, ainda, para a quantificação de três diferentes marcadores: cafeína, teobromina e ácido clorogênico. O diferencial do método proposto consiste no fato desse ter sido validado para três marcadores diferentes num único cromatograma. Os parâmetros de validação apresentaram-se conforme o recomendado pela legislação vigente, garantindo a eficiência e reprodutibilidade do método.

Os teores de cafeína, teobromina e ácido clorogênico encontrados estão de acordo com os relatados na literatura para a espécie, levando em consideração que o local, condições de cultivo e processamento da amostra, bem como o método extrativo provocam variabilidade nesses resultados.

Somada à quantificação dos marcadores químicos, a análise multivariada (aplicação de modelos quimiométricos) do perfil cromatográfico (*fingerprint*), demonstrou ser capaz de averiguar semelhanças e diferenças entre os cromatogramas avaliados (informação química sobre a planta detectável em determinada condição).

As análises de componentes principais (ACP) e de agrupamento hierárquico (AAH) permitiram classificar as sete amostras comerciais avaliadas em grupos distintos, evidenciando-se diferenças na amostra 7, que se trata da única cultivada fora do Estado do Paraná.

Este trabalho levantou uma estratégia moderna e viável para o controle de qualidade da erva-mate enquanto matéria-prima vegetal, e além de incrementar novos relatos científicos acerca da espécie, apresentou um novo método passível de ser utilizado nos laboratórios de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ABDULRA'UF, L.B.; TAN, G.H. Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry using experimental factorial design. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4344-4348, 2013.
- ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER-HEYDEN, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v.1172, p. 1-8, 2007.
- ALVARENGA, F.C.R.; GARCIA, E.F.; BASTOS, E.M.A.F; GRANDI, T.S.M.; DUARTE, M.G.R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 442-448, 2009.
- ARÇARI, D.P.; BARTCHEWSKY JR, W.; SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; DEOLIVEIRA, C.C.; GOTARDO, E.M.; PEDRAZZOLI JR, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L.F.C.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular Endocrinology**, v. 335, p. 110-115, 2011.
- ARCEUSZ, A.; MESOLOWSKI, M. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 215-220, 2013.
- ATHAYDE, M.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, p. 853-857, 2000.
- AWOTWE-OTOO, D.; AGARABI, C.; FAUSTINO, P.J.; HABIB, M.J.; LEE, S.; KHAN, M.A.; SHAH, R.B. Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 61-67, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1 ed. Campinas-SP, Editora da Unicamp, 2011.
- 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**, v. 3, n. 11, p. 234-240, 2009.
- BELTRAME, F.L. **Caracterização de duas espécies vegetais (*Trichilia catigua* e *Anemopaegma arvense*) usadas como 'catuaba' por métodos cromatográficos hifenados a métodos espectroscópicos e análise multivariada**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- BELTRAME, F.L.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F.A.P.; CORTEZ, D.A.G.; CASS, Q.B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, v.1119, p.257-263, 2006.

BERRIDGE, J.C. Chemometrics and method development in high-performance liquid chromatography. Part 1: Introduction. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 3, p. 175-188, 1988.

BIANCHINI, R.M.; CASTELLANO, P.M.; KAUFMAN, T.S. Development and validation of an HPLC method for the determination of process-related impurities in pridinol mesylate, employing experimental designs. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, p. 141–147, 2009.

BOAVENTURA, B.C.B.; DI PIETRO, P.F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; MORAIS, E.C.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E.L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899/2003. Dispõe sobre o Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira. 5 ed. 2014. Disponível em <www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em jan./2013.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239,2010.

BURRIS, K.P.; DAVIDSON, P.M.; STEWART, C.N.; HARTE, F.M. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 456-462, 2011.

CABRAL, E.C. **Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2010.

CANSIAN, R.S. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie**. 2003. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

CANTO, G.S. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saposinosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.: potencialidade como agente espumógeno**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CARRILLO, G.; BRAVO, A.; ZUFALL, C. Application of factorial designs to study factors

involved in the determination of aldehydes presente in beer by on-fiber derivatization in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4403-4411, 2011.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHEN, Y.; ZHU, S.B.; XIE, M.Y.; NIE, S.P.; LIU, W.; LI, C.; GONG, X.F.; WANG, Y.X. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. **Analytica Chimica Acta**, v.623, p. 146-156, 2008.

CONFORTI, A.S.; GALLO, M.E.; SARAVÍ, F.D. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, n. 50, p. 9-13, 2012.

COUTINHO, E.M.O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum***. (Solanaceae). 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DING, Y.; WU, E.Q.; LIANG, C.; CHEN, J.; TRAN, M.N.; HONG, C.H.; JANG, Y.; PARK, K.L.; BAE, K.; KIM, Y.H.; KANG, J.S. Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced form various countries using HPLC-based fingerprint analysis. **Food Chemistry**, v. 127, p. 755-760, 2011.

DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B.; MONDELLO, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7213-7221, 2009.

EFFERTH, T.; GRETEN, H.J. Quality control for medicinal plants. **Medicinal & Aromatic Plants**, v.1, n.7, p. 1-3, 2012.

EUA, Food and Drug Administration. **Interntational Conference of Harmonisation Q2R7**. Guidance for industries. Process Validation: General Principles and Practices, 2011.

FEKETE, S.; FEKETE, J.; GANZLER, K. Validated UPLC method for the fast and sensitive determination of steroid residues in support of cleaning validation in formulation área. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 833-838, 2009.

FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, p.1437-1446, 2000.

FORZZA, R.C. **Lista de espécies Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FREIRE, M.F.I. Plantas medicinais: a importância do saber cultivar. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 3, n.5, 2004.

GALDÁMEZ, E.V.C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002.

GARG, L.K.; REDDY, V.S.; SAIT, S.S.; KRISHNAMURTHY, T.; VALI, S.J.; REDDY, A.M. Quality by Design: design of experiments approach prior to the validation of a stability-indicating HPLC method for montelukast. **Chromatographia**, v. 76, p. 1697-1706, 2013.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, J.L.C.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 3-6, 2005.

GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. – Aquifoliaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GOSMAN, G.; BARLETTE, A.G.; DHAMER, T.; ARÇARI, D.P.; SANTOS, J.C.; CAMARGO, E.R.; ACEDO, S.; GAMBERO, A.; GNOATTO, S.C.B.; RIBEIRO, M.L. Phenolic Compounds from Maté (*Ilex paraguariensis*) Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2012. (DOI 10.1007/s11130-012-0289-x)

GOMES, S.V.F. **Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilies* Schauer**. 2009. 139f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, 2009.

HUSSEIN, G.M.E.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; HAMAO, M.; AKIYAMA, T.; TAMURA, K.; YOSHIKAWA, M. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Promotes Satiety and Body Weight Lowering in Mice: Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 12, p. 1849-1855, 2011.

ISOLABELLA, J.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

JACQUES, R.A.; SANTOS, J.G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMÃO, E.B. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 354-359, 2007.

JOTZ, G.P.; MENEZES, H.S.; ZETTLER, C.G.; ALVES, R.J.V.; CHACUR, R.; BUZZATI, C.; OLIVEIRA, M.D.; MONTES, T.H.M.; HÜBNER, M.; ZETTLER, E.W. Estudo Experimental da Erva Mate (*Ilex paraguariensis*) como Agente Etiológico de Neoplasia do Trato Aéreo-digestivo. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 10, n. 4, p. 306-311, 2006.

KANG, Y.R.; LEE, H.Y.; KIM, J.H.; MOON, D.I.; SEO, M.Y.; PARK, S.H.; CHOI, K.H.; KIM, C.R.; KIM, S.H.; OH, J.H.; CHO, S.W.; KIM, S.Y.; KIM, M.G.; CHAE, S.W.; KIM, O.; OH, H.G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**, v. 18, n. 1, p. 23-29, 2012.

KARKAMAR, S.; GARBER, R.; GENCHANOK, Y.; GEORGE, S.; YANG, X.; HAMMOND, R. Quality by design (QbD) based development of a stability indicating HPLC method for drugs and impurities. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 439-446, 2011.

KIM, H.K.; SAIFULAH; SAIFULLAH, K.; WILSON, E.G.; KRICUN, S.D.P.; MEISSNER, S.G.; DEELDER, A.M.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. **Phytochemistry**, v. 71, p. 773-784, 2010.

LI, Y.; WU, T.; ZHU, J.; WAN, L.; YU, Q.; LI, X.; CHENG, Z.; GUO, C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of and herbal medicinal preparation produced by diferente manufacturers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 597-602, 2010.

LI, L. et al. Quantitative Analysis of Five Kudinosides in the Large-leaved Kudingcha and Related Species from the Genus *Ilex* by UPLC–ELSD. **Phytochemical Analysis**, 2012. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2372/pdf>>. Acesso em mai./2012.

LIANG; Y.Z.; XIE, P.E.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.

LIN, J.T.; XU, C.J. High-performance liquid chromatography of steroidal sapogenins. **Journal of Chromatography**, v. 287, p. 105-112, 1984.

MACHADO, M.M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos efeitos biológicos e imunológicos in vitro de *Euphorbia tirucalli* L.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Santa Maria-RS, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p.214-222, 2009.

MARRASSINI, C.; ANESINI, C.; FERRARO, G. HPLC fingerprint of a flower extract of *Tilia x viridis* and correlation with antiproliferative and antioxidant activity. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1466-1471, 2011.

MARTINS, L.R.R. **Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra).** 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2009.

MARTINS, L.R.R.; PEREIRA-FILHO, E.R.; CASS, Q.B. Chromatographic proiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 469-481, 2011.

MATSUMOTO, R.L.T. **Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*).** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOLNÁR, I.; RIEGER, H.-J.; MONKS, K.E. Aspects of the “Design Space” in high pressure liquid chromatography method development. **Journal of Chromatography A**, v. 1217 p. 3192-3200, 2010.

MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos**. 6 ed. México: Editorial Limusa SA, 1991.

NETO, J.M.M; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21 (4), p. 467-469, 1998.

PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.C.; Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PAN, R.; GUO, F.; LU, H.; WEI-WEI, F.; YI-ZENG, L. Development of the chromatographic fingerprint of *Scutellaria barbata* D. Don by GC–MS combined with Chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 391-396, 2011.

PARANÁ, Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento. In: **Erva-mate, o ouro verde do Paraná**. Disponível em <<http://www.gazetadopovo.com.br/vidaecidadania/especial-erva-mate/hoje.phtml>>. Acesso em nov./2013.

PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática**. 3 ed. Campinas-SP: Millennium, 2011.

PEIXOTO, M.P.G.; KAISER, S.; VERZA, S.G.; RESENDE, P.E.; TRETER, J.; PAVEI, C.; BORRÉ, G.L.; ORTEGA, G.G. LC-UV Assay Method and UPLC/Q-TOF-MS Characterisation of Saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) Unripe Fruits. **Phytochemical Analysis**, 2011. Disponível em < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.1374/pdf>>. Acesso em mai./2012.

PELLATI, F.; ORLANDINI, G.; BENVENUTI, S. Simultaneous metabolite fingerprinting of hydrophilic and lipophilic compounds in *Echinacea pallida* by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1242, p. 43-58, 2012.

PENG, L.; WANG, Y.; ZHU, H.; CHEN, Q. Fingerprint profile of active components for *Artemisia selengensis* Turcz by HPLC–PAD combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1064-1071, 2011.

PERALTA, I.N.; COGOI, L.; FILIP, R.; ANESINI, C. Prevention of Hydrogen Peroxide-Induced Red Blood Cells Lysis by *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract: Participation of Phenolic and Xanthine Compounds. **Phytotherapy Research**, 2012. Disponível em < [wileyonlinelibrary.com](http://onlinelibrary.wiley.com) (DOI: 10.1002/ptr.4700)>. Acesso em mai./2012.

PEREIRA, C.G. Processos de obtenção de extratos e substâncias bioativas. In: SOUZA, G.H.B.; MELLO, J.C.P.; LOPES, N.P. (Org.). **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro Preto: Ed. UFOP, 2012.

PEREIRA, M.F.; CIAMPI, A.Y.; INGLIS, P.W.; SOUZA, V.A.; AZEVEDO, V.C.R. Shotgun sequencing for microsatellite identification in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 1, p. 1-3, 2013.

POMILIO, A.B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A.A. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochem. Anal.**, v.13, p. 234-241, 2002.

PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, M.S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V.S.; BOSSE, T.S.; SILVA, C.B.; CARRADORE, R.S.; MACHADO, M.S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, 465-473, 2008.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROSSATO, M. et al. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenke (Verbenaceae) do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 29(2), p. 200-202, 2006.

ROSTAGNO, M.A.; MANCHÓN, N.; D'ARRIGO, M.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; RAMOS, A.; MARTÍNEZ, J.A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, p. 204-211, 2011.

ROTH, H.J.; EGER, K.; TROCHÜTZ, R. Purines and purine isomers. In: **Pharmaceutical Chemistry**. 1 ed. Elis Horwood, 1991. pp. 589-601.

SIANI, A. C.; MICHILES, E. Medicamentos de Origem Vegetal: Cenário atual de desenvolvimento, produção e mercado. **Fármacos e Medicamentos**, v.37, p.14-18, 2005.

SILVA, E.L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, 973-979, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2007.

SNYDER, L.R.; DOLAN, J.W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. 1. Use of starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p.3-14, 1996.

TAPPIN, M.R.R.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1090–1095, 2008.

TREVISAN, R.R. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Setor de Ciências da Saúde , Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

VAN DER KOOY, F.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K.; VERPOORTE, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR bases metabolic fingerprinting. **Planta Medica**, v. 75, p. 763-775, 2009.

VERPOORTE, R; MULDER-KRIEGER, T.; VERZIIL, M.J.; VERZIIL, J.M.; BAERHEIM SVENDSEN, A. High-performance liquid chromatography of *Cinchona* alkaloids. **Journal of Chromatography**, v. 261, p. 172-175, 1983.

WANG, C.; SHI, H.; ADAMS, C.D.; GAMAGEDARA, S.; STAYTON, I.; TIMMONS, T.; YINFA, M. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, v. 45, p. 1818-1828, 2011.

WANG, L.; WANG, X.; KONG, L. Automatic authentication and distinction of *Eimedium koreanum* and *Epimedium wushanense* with HPLC fingerprint analysis assisted by pattern recognition techniques. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 40, p. 138-145, 2012.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; BUGNO, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, v. 679, p. 18-23, 2009.

WU, L.; ZHANG, Q.L.; ZHANG, X.Y.; LV, C.; LI, J.; YUAN, Y; YIN, F.X. Pharmacokinetics and blood-brain barrier penetration of (+)-catechin and (-)-epicatechin in rats by microdialysis sampling coupled to high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9377-9383, 2012.

XU, C.; LIANG, Y.; CHAU, F.; HEYDEN, Y.V. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, p. 253-259, 2006.

XU, N.; YANG, H.; CUI, M.; WAN, C.; LIU, S. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry ligand fishing assay: a method for screening triplex DNA binders from natural plant extracts. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 2562-2568, 2012.

YARIWAKE, J. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 162-168, 2005.

YANG, D.Z.; AN, Y.Q.; JIANG, X.L.; TANG, D.Q.; GAO, Y.Y.; ZHAO, H.T.; WU, X.W. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional chinese medicine preparation. **Talanta**, v. 85, p. 885-890, 2011.