

20TCA - EXTRACCIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO A PARTIR DE YERBA MATE (*Illex paraguariensis*)

BUTIUK, A. P.^{1,2}; MARTOS, M.A.²; HOURS, R. A.¹

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP, CONICET La Plata). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, (B1900ASH) La Plata, Argentina.
2. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552 - (3300) Posadas, Misiones. Argentina.
e-mail: anabutiuk@fceqvn.unam.edu.ar

Resumen

El ácido clorogénico (ACG) es un químico fino utilizado en diferentes industrias. Actualmente, no hay producción local de ACG por lo que debe ser importado. Sin embargo, la yerba mate, con cantidades significativas de ACG, constituye una fuente novedosa para la producción del compuesto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el método de extracción sólido-líquido más adecuado, para obtener un extracto rico en ACG, a partir de palo de yerba mate. Se evaluaron diferentes factores sobre el proceso de extracción sólido-líquido. La relación sólido/líquido óptima fue de 1/20 g/ml, a mayor relación disminuyó la extracción de ACG. A partir de esta relación se evaluó la cinética de extracción a 80 °C para dos tamaños de partículas: $\emptyset < 500 \mu\text{m}$ y $2,5 \times 5 \text{ mm} >$ tamaño partículas $> 1 \times 5 \text{ mm}$. La mayor concentración de ACG fue extraída con partículas de menor tamaño, siendo en este caso el proceso de extracción prácticamente instantáneo. La temperatura óptima de extracción fue de 60°C. En todos los casos, el ACG extraído en la primera y segunda etapas representó más del 90% del contenido total de ACG de las tres etapas. Se logró obtener un extracto acuoso con elevado contenido de ACG (~1,3 g/l) a partir de palos de yerba mate.

1. Introducción

Estructuralmente, el ácido clorogénico (ACG) es un éster formado entre el ácido cafeico y el L-quinico. Se han reportado actividades farmacológicas asociadas al ACG tales como agente contra el cáncer, antioxidante, antiviral, antibacterial y antifúngico con relativa baja toxicidad y efectos secundarios además de bajo potencial de desarrollo de resistencia antimicrobiana (Jiang et al., 2001; Farah y Donangelo, 2006).

El ACG está actualmente disponible en el mercado internacional tanto en forma de producto grado analítico, como así también de grado alimenticio y a granel, siendo en todos los casos considerado dentro de la categoría de Fine Chemicals. Actualmente, en nuestro país no hay producción de ACG por lo que las necesidades locales deben ser satisfechas por importación. El ACG se puede extraer de diferentes fuentes naturales, siendo el género *Eucommia* la principal fuente comercial, particularmente en el caso de empresas productoras chinas (Li et al., 2005). Recientemente se ha popularizado su extracción a partir de granos de café verde. Sin embargo, resulta notable mencionar que la yerba mate (*Illex paraguariensis*), con contenidos del orden del 10 % (p/p) en base seca (Marques y Farah, 2009; Isolabella et al., 2010; Pagliosa et al., 2010), puede constituir una fuente totalmente novedosa, autóctona, aún no explotada y altamente competitiva para la producción industrial de este compuesto.

La yerba mate es un cultivo tradicional de la Provincia de Misiones, Argentina y de la región noreste de la Provincia de Corrientes-Argentina. El proceso de producción de la

yerba mate implica las etapas de cosecha, zapecado, secado, molienda, estacionamiento y envasado. A lo largo de las diferentes etapas del procesamiento industrial podrían producirse algunos cambios en el perfil y en la concentración de los compuestos bioactivos de la yerba mate (López et al., 2006). Estudios previos demostraron que el contenido de ACG de la yerba mate varía según la época de cosecha y en las distintas etapas de su procesamiento, y que la mayor concentración se encuentra en la yerba mate recién cosechada, tanto en hoja como en palo (Butiuk et al., 2014).

La eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos en materiales vegetales depende de varios parámetros como la temperatura, el tiempo, tamaño de partícula, entre otros, y sus efectos pueden ser independientes o interactivos (Mylonaki et al., 2008; Naczki y Shahidi, 2004). Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la extracción de compuestos fenólicos a partir de yerba mate, bajo diferentes condiciones (Lunceford y Gugliucci, 2005; Ramírez-Mares et al., 2004). Murakami et al. (2011) han estudiado la optimización de la extracción acuosa de estos compuestos a partir de hojas de *I. paraguariensis*. Sin embargo, a la fecha, no existen estudios sobre la extracción acuosa de ACG, a partir de la fracción denominada “palos” de *I. paraguariensis*.

De acuerdo a lo antes mencionado y teniendo en cuenta que el “palo” resulta un residuo actualmente poco valorado en la industria yerbatera, el objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes factores que influyen en el proceso de extracción acuosa de ACG a partir de muestras de palo de yerba mate recién cosechado, a los efectos de obtener un extracto acuoso con elevado contenido de ACG.

2. Metodología

2.1. Productos químicos

Para las extracciones se utilizó agua destilada mientras que para la determinación del contenido de ACG se utilizaron los siguientes reactivos: ácido clorogénico (ACG) (Sigma, 98 % p/p de pureza), agua (Panreac, grado HPLC), ácido fórmico (Tedia, 96 % de pureza y grado HPLC) y acetonitrilo (J.T. Baker, grado HPLC).

2.2. Preparación de la muestra

En el presente estudio se utilizó como materia prima yerba mate sin procesar (hojas y palos), manualmente recolectada al final de la época de zafra (meses de agosto-septiembre de 2014) proveniente de un establecimiento de yerba mate (La Cachuera S.A.) ubicado al Sur de la Provincia de Misiones, Argentina. Este material vegetal fue sometido a un tratamiento térmico para inhibir la actividad enzimática, dentro de las 36 h posteriores a la cosecha. Se realizó un cuarteo sucesivo y posterior remoción manual de las fracciones de hoja y palo. Esta última fracción (palos) fue molida utilizando un molino de cuchillas y posteriormente tamizada, seleccionándose las partículas que atravesaron una malla de 2,5 x 5 mm y fueron retenidas en una de 1 x 5 mm ($2,5 \times 5 \text{ mm} > \text{tamaño de partícula} > 1 \times 5 \text{ mm}$) y aquellas partículas que atravesaron una malla con diámetro de apertura de 500 μm ($\text{Ø partícula} < 500 \mu\text{m}$). Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su utilización y por un tiempo no mayor a los 90 días.

2.3. Preparación de los extractos

Para la extracción de ACG, la cantidad correspondiente de muestra se adicionó a frascos Erlenmeyers de 50 ml que contenían 25 ml de agua destilada (pH 5,8). Los mismos fueron incubados en baño termostático con agitación, a tiempos y temperaturas variables. Los extractos obtenidos se filtraron con filtro de nitrato de celulosa (Sartorius, 0,45 μm) y se conservaron a 4 °C, hasta 4 días.

2.4. Efecto de la relación sólido/líquido

Se evaluaron las siguientes relaciones sólido/líquido (S/L) sobre el proceso de extracción de ACG (g/ml): 1/150 (6,67 g/l), 1/100 (10 g/l), 1/50 (20 g/l), 1/20 (50 g/l) y 1/10 (100 g/l). Los extractos fueron incubados en un baño termostatzado durante 30 min a 95-100 °C, con agitación constante.

2.5. Evaluación del número de extracciones

El efecto del número de extracciones de ACG fue evaluado utilizando la relación óptima S/L seleccionada en la etapa anterior, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego de la primera extracción, el residuo fue resuspendido en 25 ml de agua destilada y el proceso se repitió dos veces más.

2.6. Efecto del tamaño de partícula y la temperatura de extracción

Se estudió el efecto del tamaño de partícula ($2,5 \times 5 \text{ mm} > \text{tamaño de partícula} > 1 \times 5 \text{ mm}$ y $\text{Ø partícula} < 500 \mu\text{m}$) y el efecto de la temperatura de extracción en el rango de 30 a 100 °C, utilizando la relación óptima S/L seleccionada en la etapa anterior.

2.7. Determinación del contenido de ácido clorogénico

La identificación y cuantificación del ACG se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con gradiente, utilizando un equipo Shimadzu Prominence, equipado con un autosampler Shimadzu SIL-20 A HT y un detector de arreglo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M20A. El volumen de inyección fue de 20 μl y la separación se realizó en una columna de fase reversa C18 Phenomenex Prodigy ODS3, con un gradiente binario compuesto por ácido fórmico al 1 % en agua deionizada y acetonitrilo. La identificación del ACG se llevó a cabo por comparación de los picos con el tiempo de retención del compuesto estándar (Carini et al. 1998, Fang et al. 2002; Bravo et al. 2006).

2.8. Análisis Estadístico

Las experiencias se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como media \pm error estándar. Para el análisis de los datos experimentales se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un análisis post-hoc mediante la prueba de Tukey. Todas las comparaciones fueron realizadas con un nivel de confianza del 95 %. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows 3.0.

3. Resultados

3.1. Efecto de la relación sólido/líquido

En la Figura 1 se presenta la concentración de ACG extraído a partir de palos de yerba mate molidos ($\text{Ø} < 500 \mu\text{m}$), para las cinco relaciones S/L examinadas.

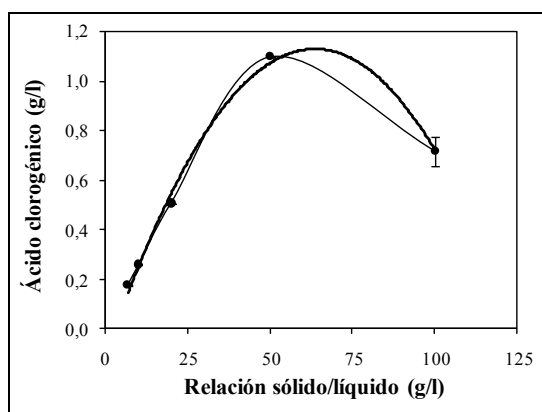


FIGURA 1. Efecto de la relación sólido/líquido sobre la extracción acuosa de ácido clorogénico a partir de palos de yerba mate molidos (\emptyset partícula < 500 μm), durante un periodo de extracción de 30 min a 95-100 °C (la línea en negra muestra la tendencia polinómica).

Como se observa en la Figura 1, la extracción de ACG se incrementó, al aumentar la relación S/L, obteniéndose la máxima extracción ($1,099 \pm 0,001$ g ACG/l) con una relación 1/20 g/ml (50 g/l). Al utilizar una relación de 1/10 g/ml (100 g/l), la extracción fue menor, lo cual se pudo deber a un exceso de soluto respecto al solvente utilizado (Nawaz et al., 2006). El siguiente modelo de regresión expresa la cantidad de ACG extraído para una relación S/L específica.

$$\text{ACG} = -0,0003 x^2 + 0,0387 x - 0,0968 \quad (1)$$

3.2. Evaluación del número de extracciones

En la Figura 2 se presenta el porcentaje de ACG obtenido en cada etapa de extracción, a partir de palos de yerba mate molidos (\emptyset partícula < 500 μm) para las relaciones S/L 1/20 y 1/10.

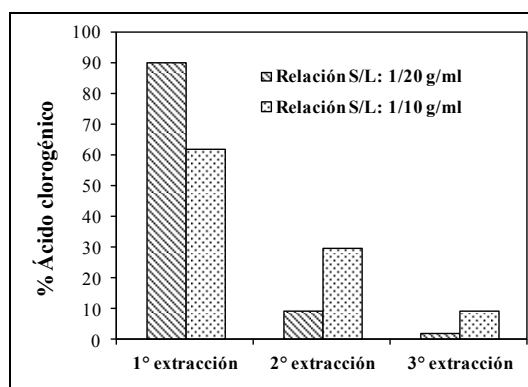


FIGURA 2. Porcentaje de ácido clorogénico extraído en cada etapa de extracción a partir de palos de yerba mate molidos (\emptyset partícula < 500 μm), durante un periodo de extracción de 30 min a 95-100 °C.

El mayor porcentaje de ACG fue extraído en la primer etapa, siendo del 90% y del 67% respecto al total extraído, para las relaciones 1/20 y 1/10, respectivamente. Las cantidades de ACG extraídas disminuyeron en las subsecuentes etapas de extracción, siendo prácticamente despreciable en la tercera etapa para la relación 1/20 (Figura 2). El ACG extraído en las dos primeras etapas representó el 98,5% ($1,244 \pm 0,043$ g ACG/l) y el 91,1% ($1,116 \pm 0,016$ g ACG/l) para las relaciones 1/20 y 1/10, respectivamente. Esto está de acuerdo con lo informado por otros autores quienes estudiaron la extracción de polifenoles a partir de diferentes materiales vegetales (Shi et al., 2003; Nawaz et al., 2006).

3.3. Efecto tamaño de partícula sobre la extracción de ACG

La influencia del tamaño de partícula sobre la extracción acuosa de ACG a 80 °C y utilizando una relación S/L de 1/20 se muestra en la Figura 3.

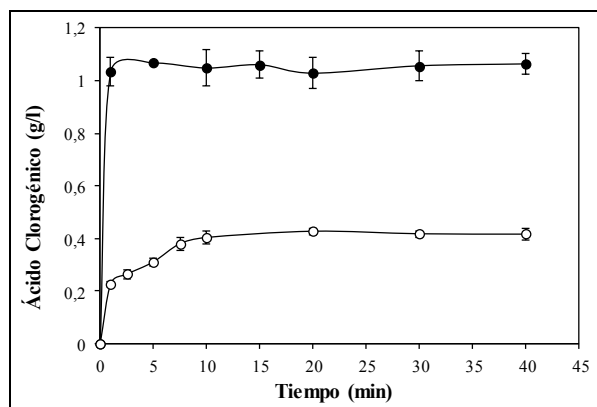


FIGURA 3. Influencia del tamaño de partícula sobre la extracción acuosa de ácido clorogénico a partir de palos de yerba mate, a 80 °C y una relación sólido/líquido = 1/20 g/ml. Símbolos: \varnothing partícula <math>< 500 \mu\text{m}</math> (\circ) y $2,5 \times 5 \text{ mm} > \text{tamaño partículas} > 1 \times 5 \text{ mm}</math> (\bullet).$

Los resultados observados muestran que la mayor concentración de ACG extraída fue con partículas de menor tamaño (\varnothing partícula <math>< 500 \mu\text{m}</math>) y estuvo en el orden de $1,051 \pm 0,015 \text{ g/l}$, mientras que la concentración de ACG extraída a partir de partículas de mayor tamaño ($2,5 \times 5 \text{ mm} > \text{tamaño de partícula} > 1 \times 5 \text{ mm}$) fue de $0,416 \pm 0,010 \text{ g/l}$. Para las partículas de mayor tamaño, la velocidad de extracción de ACG aumentó en función del tiempo, hasta los 20 min, tiempo a partir del cuál permaneció constante. El análisis de varianza reveló que no hubo diferencias significativas en el tiempo de extracción para las partículas de menor tamaño, demostrando que la extracción de ACG fue prácticamente instantánea para la temperatura evaluada ($p \leq 0,05$).

Negrão Murakami et al. (2011) y Aguiar Prudêncio et al. (2012) al estudiar la extracción acuosa de polifenoles a partir de hojas de yerba mate y a partir de residuos de la corteza de yerba mate, respectivamente, reportaron que la variable tiempo no ejerció una influencia significativa durante el proceso de extracción ($p \leq 0,05$).

3.4. Efecto de la temperatura sobre la extracción de ACG

En la Figura 4 se observa la influencia de la temperatura sobre la extracción de ACG a partir los dos tamaños de partículas estudiadas, durante un período de extracción de 5 min (\varnothing partícula <math>< 500 \mu\text{m}</math>) y de 30 min ($2,5 \times 5 \text{ mm} > \text{tamaño partículas} > 1 \times 5 \text{ mm}$).

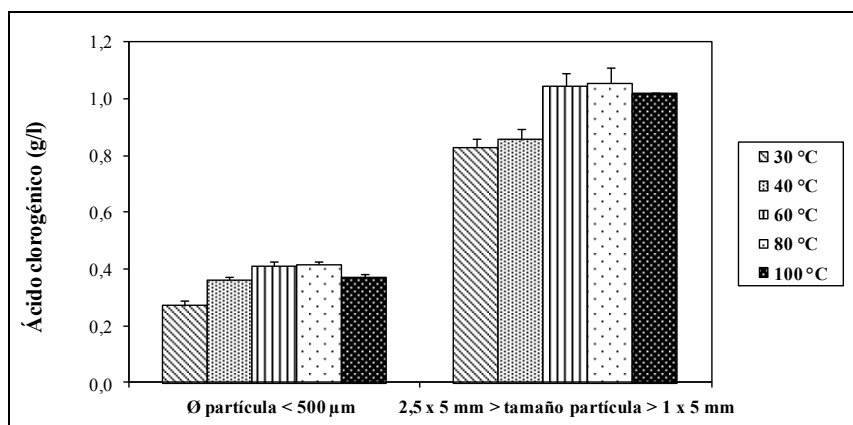


FIGURA 4. Influencia de la temperatura sobre la extracción acuosa de ácido clorogénico a partir de palos de yerba mate de diferentes tamaños, utilizando una relación sólido/líquido = 1/20 g/ml, durante un

período de extracción de 5 min (\emptyset partícula < 500 μm) y de 30 min (2,5 x 5 mm > tamaño partículas > 1 x 5 mm).

Al aumentar la temperatura se produjo un incremento en la extracción de ACG para ambos tamaños de partículas evaluados. La mayor concentración de ACG se obtuvo a 60 °C para ambos tamaños de partículas. El análisis de varianza reveló que no hubo diferencias significativas en la extracción de ACG entre las temperaturas de 60 y 80 °C para ambos tamaños de partículas ($p \leq 0,05$). En ambos casos, la extracción de ACG disminuyó levemente a 100 °C. Prudêncio et al. (2012) quienes han estudiado la extracción acuosa de polifenoles a partir de residuos de yerba mate, han reportado que una temperatura superior a 90 °C, produjo un decrecimiento en la extracción de compuestos fenólicos.

4. Conclusiones

En el presente estudio, la extracción de ACG a partir de palos de yerba mate estuvo influenciada principalmente por la relación S/L, el tamaño de partícula y la temperatura de extracción. El tiempo de extracción tuvo influencia significativa únicamente para las partículas de mayor tamaño.

Un sistema de dos extracciones consecutivas, a 60 °C y con una relación S/L de 1/20 g/ml sería necesario para extraer la mayor parte del ACG presente en el palo de yerba mate tanto para partículas de $\emptyset < 500 \mu\text{m}$ (extracción instantánea) como para aquellas entre 2,5 x 5 mm y 1 x 5 mm.

5. Bibliografía

- Aguiar Prudêncio, A.P.; Prudêncio, E. S.; Castanho Amboni, R.D.M.; Negrão Murakami, A.N.; Maraschin, M.; Cunha Petrus, J.C.; Ogliari, P.J.; Santos Leite, R. (2012). Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. *Food and bioproducts processing* 90: 399–405.
- Butiuk, A.P.; Maidana, A.S.; Martos, M.A.; Hours, R.A. Variación del contenido de ácido clorogénico durante el procesamiento de la yerba mate (*Illex paraguariensis*). V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina, 17 a 19 de Noviembre de 2014.
- Farah, A.; Donangelo, C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 23–36.
- Isolabella, S.; Cogoi, L.; López, P; Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R. (2010). Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 122: 695-699.
- Jiang, Y.; Satoh, K.; Watanabe, S. (2001). Inhibition of chlorogenic acid induced cytotoxicity by CoC₁₂. *Anticancer Research*, 21: 3349-3353.
- Li, H.; Chen, B.; Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochem.*, 12: 295–300.
- López, O.; Isolabella, S.; Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R. (2006). Estudio cuali-cuantitativo por HPLC de los principios activos presentes en los extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) en las diferentes etapas del procesamiento industrial. En: Libro Actas del IV Congreso Sudamericano de la Yerba Mate (1ra edición). Posadas, Argentina: INYM, INTA, UNAM, EPAGRI.
- Lunceford, N. y Gugliucci, A. (2005). *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76: 419 - 427.
- Marques, V.; Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal

- plants and infusions. *Food Chemistry*, 113: 1370-1376.
- Mylonaki, S.; Kiassos, E.; Makris, D. P.; Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392: 977 - 985.
- Naczek, M. y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95 - 111.
- Nawaz, H.; Shi, J.; Mittal, G.S.; Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48: 176 – 181.
- Negrão Murakami, A.N.; Dias de Mello Castanho Amboni, R.; Prudêncio, E.S.; Amante, E.R.; de Moraes Zanotta, L.; Maraschin, M.; Cunha Petrus, J.C.; Teófilo, R.F. (2011). Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. *LWT . Food Science and Technology*, 44: 2211 - 2216.
- Pagliosa, C.M.; Vieira, M.A.; Podestá, R.; Maraschin, M.; Bertello Zeni, A.L.; Amante, E.R.; Dias de Mello Castanho Amboni, R. (2010). Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil). *Food Chemistry*, 122: 173-178.
- Ramirez-Mares, M. V.; Chandra, S. y Mejia, E. G. (2004). In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554: 53 - 65.
- Shi, J.; Yu, J.; Pohorly, J.; Young, C.; Bryan, M. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution, *J. Food Agric. Environ*, 1 (2): 42.