

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
CHÁ-VERDE BRASILEIRO
(*Camellia sinensis* var. *assamica*) Cultivar IAC-259**

SAMUEL TAKASHI SAITO

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
CHÁ-VERDE BRASILEIRO
(*Camellia sinensis* var. *assamica*) Cultivar IAC-259

Dissertação apresentada por **Samuel Takashi Saito**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Bergold
Co-orientadora: Prof. Dra. Grace Gosmann

Porto Alegre, 2007

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.04.2007, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Edna Sayuri Suyenaga
Centro Universitário Feevale

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. José Ângelo da Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

S158e Saito, Samuel Takashi

Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *assamica*) cultivar IAC-259/ Samuel Takashi Saito – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xxiv, 112p.: il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Chá-verde brasileiro. 2. *Camellia sinensis*. 3. Validação: métodos analíticos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Atividade antioxidante. 6. Catequinas. 7. Cafeína. 8. Theaceae. I. Bergold, Ana Maria. II. Gosmann, Grace. III. Título.

CDU: 615.2.011:582.823

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados: no LAPPS – Laboratório de Produção de Padrões Secundários, no Laboratório de Fitoquímica e no Laboratório da Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, assim como, no Laboratório de Biofísica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório do Centro de Pesquisas em Ciências Médicas – ULBRA, aos quais eu expresso meus sinceros agradecimentos.

À Verônica,
minha esposa e minha flor,
sempre minha companheira
para o que der e o que for.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu esta oportunidade e este desafio para conquistar.

Às professoras Dra. Ana Maria Bergold e Dra. Grace Gosmann pela orientação, pelo incentivo, atenção e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao LAPPS – Laboratório de Produção de Padrões Secundários, por oferecer toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento e validação deste trabalho.

A Central Analítica-FACFAR/UFRGS pela utilização do liofilizador.

À Industria de Chá Ouro-Preto/SP pelo fornecimento das matérias-primas.

Aos professores Dr. Pedro Eduardo Fröhlich, Dr. Jarbas Alves Montanha e Dr. José Carlos Germani, pelo convívio e pronto auxílio quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UFRGS, pela oportunidade.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, sempre.

A minha irmã Dirce pelo incentivo nos momentos difíceis e também nos bons, pelo abraço e pelas orações; também a minha cunhada Júlia por ter vindo da Bahia dar aquela “força” à minha esposa no período do mestrado. Com vocês divido a alegria desta conquista.

Aos professores Dr. Marc François Ritcher e Dra. Jenifer Saffi do Programa de Pós-Graduação em GT-ULBRA pela colaboração.

Aos meus amigos e colegas (atuais e antigos) do LAPPS: Alexandre “Xandeco”, Andréa, Carolina, Eliane, Inara, Laura, Letícia, Lúcia, Luís Liscano, Marquinhos, Sirlei, Tiaguinho, Rochele e aos colegas do Laboratório de Fitoquímica: Juli, Simone e Ana, por tornarem o local de trabalho aprazível.

À Dinara, ao Renato e o restante do pessoal do Laboratório de Biofísica do Centro de Biotecnologia da UFRGS pela disponibilização dos equipamentos para fazer o ensaio enzimático.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT	xxiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	05
2.1 Objetivo geral.....	07
2.2 Objetivos específicos.....	07
3 REVISÃO.....	08
3.1 Descrição da planta.....	10
3.2 Constituição química.....	10
3.3 Atividade antioxidante.....	12
3.4 Atividade quimiopreventiva e antitumoral.....	13
3.5 Atividade antidiabética.....	14
3.6 Outras atividades farmacológicas.....	15
3.7 Toxicidade, efeitos adversos e superdosagem.....	16
3.8 Métodos de extração e de quantificação de componentes químicos.....	16
3.9 Métodos de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	19
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	22
4.1 Substâncias químicas, reagentes e equipamentos.....	24
4.2 Matéria vegetal.....	25
4.3 Obtenção do extrato liofilizado.....	26
4.3.1 Obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 1.....	26
4.3.2 Obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 2.....	27
4.3.3 Obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 3.....	28
4.4 Obtenção da amostra através da decocção assistida.....	28
4.5 Determinação simultânea das catequinas e cafeína em chá-verde brasileiro por cromatografia líquida de alta eficiência.....	29
4.5.1 Condições do sistema.....	29
4.5.1.1 Condições cromatográficas.....	29
4.5.1.2 Fase móvel (FM) e solução de diluição (SD).....	29
4.5.1.3 Decoctos de chá-verde.....	29
4.6 Validação da metodologia CLAE-DAD.....	30
4.6.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	30
4.6.2 Preparo das curvas-padrão.....	31
4.6.2.1 Preparo das misturas das substâncias químicas de referência.....	31
4.6.3 Preparo das amostras.....	32
4.6.4 Exatidão.....	32

4.6.4.1 Preparo das soluções amostra e solução-mãe das substâncias químicas de referência.....	32
4.6.5 Precisão.....	34
4.6.6 Especificidade.....	34
4.6.7 Limite de detecção.....	34
4.6.8 Limite de quantificação.....	34
4.6.9 Robustez.....	35
4.7 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	35
4.7.1 Método fotocolorimétrico do DPPH [•]	35
4.7.2 Método enzimático do sistema hipoxantina/xantina oxidase.....	39
4.7.2.1 Preparo da solução reagente em tampão fosfato (pH 6,5).....	39
4.7.2.2 Reação enzimática.....	40
4.7.2.3 Análise por CLAE-DAD.....	40
4.7.2.4 Apresentação dos resultados.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Rendimento dos extratos liofilizados.....	43
5.2 Determinação simultânea das catequinas e cafeína nas amostras de chá-verde, por CLAE-DAD.....	44
5.2.1 Desenvolvimento do método.....	44
5.2.2 Identificação dos compostos por CLAE-DAD.....	46
5.2.2.1 Espectros UV das substâncias químicas de referência.....	47
5.2.2.2 Análise do tempo de retenção.....	47
5.2.2.3 Adição da substância de referência na amostra.....	49
5.2.2.4 Comparação dos espectros UV e índice de similaridade.....	50
5.3 Validação.....	54
5.3.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	54
5.3.2 Linearidade.....	56
5.3.3 Precisão.....	57
5.3.4 Exatidão.....	57
5.3.5 Especificidade.....	59
5.3.6 Limite de detecção.....	60
5.3.7 Limite de quantificação.....	61
5.3.8 Robustez.....	61
5.4 Teores de catequinas e cafeína encontrados nos chás-verde brasileiro.....	62
5.5 Teores de catequinas e cafeína encontrados nos extratos liofilizados.....	63
5.5.1 Análise estatística entre os sistemas.....	68
5.6 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	70
5.6.1 Método fotocolorimétrico do DPPH [•]	70
5.6.1.1 Correlação das amostras de chá-verde brasileiro com a atividade antioxidante.....	75
5.6.2 Método enzimático do sistema xantina oxidase/hipoxantina.....	78
6 CONCLUSÕES.....	86
7 REFERÊNCIAS.....	90
8 ANEXOS	98

ANEXO 1: Tabelas complementares

ANEXO 2: Artigo publicado na Revista Chromatography

LISTA DE ABREVIATURAS

α - seletividade

ACN – acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

AG – ácido gálico

ANOVA – análise de variância

C – catequina

CAF - cafeína

CE₅₀ – concentração efetiva para se obter 50% do máximo da atividade estimada em 100%

CG - galato de catequina

CVB-P – chá-verde brasileiro colhido na primavera

CVB-V – chá-verde brasileiro colhido no verão

DAD – detector de arranjo de diodos

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo

DPPH[·] – radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila

EC – epicatequina

EACI1A – Extrato liofilizado de amostra comercial importada (marca 1) e obtido pelo sistema 1

EACI2A – Extrato liofilizado de amostra comercial importada (marca 2) e obtido pelo sistema 1

EACN1A – Extrato liofilizado de amostra comercial nacional (marca 1) e obtido pelo sistema 1

EACN2A – Extrato liofilizado de amostra comercial nacional (marca 2) e obtido pelo sistema 1

EACN3A – Extrato liofilizado de amostra comercial nacional (marca 3) e obtido pelo sistema 1

ECVB-P1A - Extrato liofilizado de CVB-P1 e obtido pelo sistema 1

ECVB-P1B - Extrato liofilizado de CVB-P1 e obtido pelo sistema 2

ECVB-P1C - Extrato liofilizado de CVB-P1 e obtido pelo sistema 3

ECVB-P2A - Extrato liofilizado de CVB-P2 e obtido pelo sistema 1

ECVB-P2B - Extrato liofilizado de CVB-P2 e obtido pelo sistema 2
ECVB-P2C - Extrato liofilizado de CVB-P2 e obtido pelo sistema 3
ECVB-P3A - Extrato liofilizado de CVB-P3 e obtido pelo sistema 1
ECVB-P3B - Extrato liofilizado de CVB-P3 e obtido pelo sistema 2
ECVB-P3C - Extrato liofilizado de CVB-P3 e obtido pelo sistema 3
ECVB-V1A - Extrato liofilizado de CVB-V1 e obtido pelo sistema 1
ECVB-V1B - Extrato liofilizado de CVB-V1 e obtido pelo sistema 2
ECVB-V1C - Extrato liofilizado de CVB-V1 e obtido pelo sistema 3
ECVB-V2A - Extrato liofilizado de CVB-V2 e obtido pelo sistema 1
ECVB-V2B - Extrato liofilizado de CVB-V2 e obtido pelo sistema 2
ECVB-V2C - Extrato liofilizado de CVB-V2 e obtido pelo sistema 3
ECVB-V3A - Extrato liofilizado de CVB-V3 e obtido pelo sistema 1
ECVB-V3B - Extrato liofilizado de CVB-V3 e obtido pelo sistema 2;
ECVB-V3C - Extrato liofilizado de CVB-V3 e obtido pelo sistema 3;
ECG – galato de epicatequina
EGC – galato de galocatequina
EGCG – galato de epigalocatequina
e.p.m. – erro padrão da média
ERO – espécies reativas ao oxigênio
EtOH – etanol
GC - galocatequina
GCG – galato de galocatequina
 k' – fator de retenção
Me₂CO - acetona
MeOH – metanol
N – eficiência da coluna (número de pratos teórico)
NI – não informado
NPK – adubo composto por nitrogênio:fósforo:potássio
Rs – Resolução
SD – Solução de Diluição
SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida
SNK – *Student-Newman-Keuls*
SQR – substância química de referência
T – fator de cauda

TFA – ácido trifluoracético

TR – tempo de retenção

P' – Polaridade do solvente

p.a. – pró análise

QEAA – quantidade equivalente em ácido ascórbico

VIH – vírus da imunodeficiência humana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais componentes presentes em <i>Camellia sinensis</i>	11
Figura 2 – Estrutura molecular do radical DPPH*.....	19
Figura 3 – Esquema da geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) no sistema hipoxantina/xantina oxidase.....	20
Figura 4 – Gráfico representando o rendimento médio com os respectivos e.p.m. (n=13) da extração do chá-verde brasileiro pelos três sistemas selecionados.....	44
Figura 5 – Cromatograma das SQR.....	46
Figura 6 – Espectro UV de cada pico referente ao cromatograma da Fig. 5.	48
Figura 7 – Cromatograma das SQR sobreposto com ECVB-V1A.....	49
Figura 8 – Cromatograma da amostra ECVB-V1A na concentração de 2002 µg/ml sobreposto com a mesma amostra com adição das SQR.....	50
Figura 9 – Sobreposição dos espectros de SQR de cafeína com quatro espectros da amostra de tempo de retenção próximos da cafeína.....	51
Figura 10 – Espectro da SQR de epigalocatequina sobreposto com espectro do pico de TR = 6,11 min da amostra.....	51
Figura 11 – Espectro da SQR de catequina sobreposto com espectro do pico de TR = 7,80 min da amostra.....	51
Figura 12 – Sobreposição dos espectros de SQR de epicatequina com espectros com tempo de retenção próximos na amostra.....	52
Figura 13 – Espectro da SQR de galato de epigalocatequina sobreposto com espectro do pico de TR = 14,50 min da amostra.....	52
Figura 14 – Espectro da SQR de galato de galocatequina sobreposto com espectro do pico de TR = 21,37 min da amostra.....	53
Figura 15 – Espectro da SQR de galato de epicatequina sobreposto com espectro do pico de TR = 32,15 min da amostra.....	53
Figura 16 – Espectro do radical DPPH* em solução metanólica (169,9 µM) com seus máximos: 1 – 515 nm e 2 – 323,5 nm.....	70
Figura 17- Espectro do DPPH* (169,9 µM) reduzido por EGCG (8,32 µg/ml) com seu máximo de absorção em 323 nm.....	71

Figura 18 – Correlação entre teor de galato de epicatequina e atividade antioxidante.....	76
Figura 19 – Correlação entre teor de galato de epigallocatequina e atividade antioxidante.....	76
Figura 20 – Correlação entre teor de catequinas totais e atividade antioxidante.....	77
Figura 21 – Correlação entre teor de epigallocatequina e atividade antioxidante.....	77
Figura 22 – Correlação entre teor de epicatequina e atividade antioxidante.	78
Figura 23 – Correlação entre teor de catequina e atividade antioxidante.....	78
Figura 24 – Cromatograma do controle positivo.....	80
Figura 25 – Cromatograma do controle positivo obtido pelo método proposto por OWEN e colaboradores (2000), a 325 nm.....	80
Figura 26 – Cromatograma da amostra tratada com chá-verde sobreposto com controle positivo.....	80
Figura 27 – Cromatograma do branco (amostra não-tratada sem enzima), no comprimento de onda de 325 nm.....	81
Figura 28 – Cromatograma do controle positivo pelo método isocrático.....	81
Figura 29 – Cromatograma da amostra tratada com chá-verde em 325 nm sobreposto com a mesma amostra em 280 nm.....	82
Figura 30 – A: Sobreposição dos cromatogramas das amostras tratadas com EGCG em várias concentrações; B: sobreposição dos cromatogramas das amostras tratadas com AG em várias concentrações. Leitura em 325 nm.....	82
Figura 31 – Cromatograma do controle positivo sobreposto com vários cromatogramas das amostras tratadas com extrato liofilizado de chá-verde	83
Figura 32 – Mecanismo proposto por FURUKAWA e colaboradores (2003) do dano oxidativo induzido por EGCG na presença de metais de transição.	84
Figura 33 – Modelo proposto por AZAM e colaboradores (2004) na formação de quinonas mediado por Cu II.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos métodos utilizados para a determinação simultânea de componentes do chá-verde por cromatografia líquida de alta eficiência.....	18
Tabela 2 – Especificações das substâncias químicas utilizadas.....	24
Tabela 3 – Datas das colheitas do chá-verde brasileiro e seu respectivos códigos.....	25
Tabela 4 – Código, procedência e descrição das amostras comerciais.....	26
Tabela 5 – Condições experimentais do método isocrático por CLAE.....	29
Tabela 6 – Concentração final de cada solução, em µg/ml, utilizadas para construção da curva padrão com cinco pontos.....	32
Tabela 7 – Concentração final de cada componente, em µg/ml, presente nas soluções A, AA ₁ e AA ₂	33
Tabela 8 – Concentração final de cada substância de referência, em µg/ml, utilizadas no estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	36
Tabela 9 – Concentração final de cada extrato liofilizado extraído pelo sistema 1, em µg/ml, utilizadas no estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	36
Tabela 10 – Concentração final de cada extrato liofilizado obtido pelo sistema 2, em µg/ml, utilizados no estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	37
Tabela 11 – Concentração final de cada extrato liofilizado obtido pelo sistema 3, em µg/ml, utilizados no estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	37
Tabela 12 – Concentração final de cada extrato liofilizado das amostras comerciais obtido pelo sistema 1, em µg/ml, utilizados no estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	38
Tabela 13 – Absorção no UV e identidade dos picos do cromatograma da Figura 6.....	46
Tabela 14 – Índice de similaridade de cada espectro do pico analisado da amostra frente ao respectivo espectro da substância química de referência...	54
Tabela 15 – Dados obtidos (TR, área e DPR) durante os testes para adequabilidade do sistema cromatográfico.....	55
Tabela 16 – Valores médios obtidos na avaliação dos parâmetros de Rs, k', a, T e N nas soluções das SQR, obtidos durante a realização dos testes para adequabilidade do sistema cromatográfico.....	55
Tabela 17 – Resultados obtidos no estudo da linearidade (P < 0,05) das curvas-padrão.....	56

Tabela 18 – Valores experimentais obtidos na determinação da repetibilidade e da precisão intermediária do método.....	57
Tabela 19 – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método.....	58
Tabela 20 – Índice de pureza do pico cromatográfico obtido através da curva de pureza para cada componente.....	60
Tabela 21 – Limite de detecção para cada substância de interesse.....	60
Tabela 22 – Limite de quantificação para cada substância de interesse.....	61
Tabela 23 – Avaliação da robustez do método.....	65
Tabela 24 – Composição (teor % \pm DP) dos componentes majoritários das decocções assistidas de chá-verde brasileiro.....	65
Tabela 25 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 1.....	66
Tabela 26 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 2.....	66
Tabela 27 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 3.....	67
Tabela 28 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de amostras comerciais de chá-verde obtidos pelo sistema 1.....	67
Tabela 29 – Análise estatíst. de eficiência entre os sistemas. ANOVA(SNK)..	68
Tabela 30 – Relação dos teores de EGCG/CAF nos extratos liofilizados, por sistema de extração.....	69
Tabela 31 – Relação dos teores de ECG/CAF nos extratos liofilizados, por sistema de extração.....	69
Tabela 32 – Relação dos teores de (ECG +EGCG)/CAF nos extratos liofilizados, por sistema de extração.....	69
Tabela 33 – Dados das curvas-padrão do DPPH* e das SQR.....	71
Tabela 34 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 1.....	71
Tabela 35 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 2.....	72

Tabela 36 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 3.....	72
Tabela 37 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de amostras comerciais de chá-verde obtido pelo sistema 1.....	72
Tabela 38 – CE ₅₀ das substâncias analisadas e seus respectivos valores equivalentes a 1 g de ácido ascórbico.....	74
Tabela 39 – Correlação CE ₅₀ (DPPH*) <i>versus</i> teor de cada componente do chá-verde e teste de significância (t-Student P < 0,05).....	75
Tabela 40 – Dados relativos à linearidade do método para o ácido gálico, por CLAE-DAD em 280 nm.....	100
Tabela 41 – Dados relativos à linearidade do método para a catequina por CLAE-DAD em 280 nm.....	100
Tabela 42 – Dados relativos à linearidade do método para a cafeína por CLAE-DAD em 280 nm.....	100
Tabela 43 – Dados relativos à linearidade do método para a epicatequina por CLAE-DAD em 280 nm.....	101
Tabela 44 – Dados relativos à linearidade do método para o galato de epicatequina por CLAE-DAD em 280 nm.....	101
Tabela 45 – Dados relativos à linearidade do método para a epigallocatequina por CLAE-DAD em 280 nm.....	101
Tabela 46 – Dados relativos à linearidade do método para o galato de epigallocatequina por CLAE-DAD em 280 nm.....	102
Tabela 47 – Dados relativos à linearidade do método para o galato de galocatequina por CLAE-DAD em 280 nm.....	102

Tabela 48 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do ácido gálico, por CLAE-DAD em 280 nm.....	102
Tabela 49 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da catequina, por CLAE-DAD em 280 nm.....	102
Tabela 50 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da cafeína, por CLAE-DAD em 280 nm.....	103
Tabela 51 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da epicatequina, por CLAE-DAD em 280 nm.....	103
Tabela 52 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do galato de epicatequina, por CLAE-DAD em 280 nm.....	103
Tabela 53 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da epigalocatequina, por CLAE-DAD em 280 nm.....	103
Tabela 54 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do galato de epigalocatequina, por CLAE-DAD em 280 nm.....	104
Tabela 55 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do galato de galocatequina, por CLAE-DAD em 280 nm.....	104
Tabela 56 – Valores experimentais obtidos na quantificação do DPPH' para avaliação da atividade antioxidante, por espectrofotometria no visível.....	104

RESUMO

Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *assamica*) Cultivar IAC-259

O chá-verde brasileiro, obtido a partir das partes aéreas de *Camellia sinensis* var. *assamica*, teve sua produção recentemente implantada no Brasil devido ao emergente consumo. As principais atividades farmacológicas atribuídas a esta planta estão relacionadas à atividade antioxidante, quimiopreventiva e antitumoral. Neste trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliar o perfil dos constituintes majoritários [galato de epigalocatequina (EGCG), epigalocatequina, cafeína, galato de epicatequina (ECG) e epicatequina] do chá-verde brasileiro coletado na primavera e verão, e utilizando diferentes sistemas de extração. A resposta foi linear na faixa de 37-185 µg/ml para cafeína, 99-500 µg/ml para EGC, 20-100 µg/ml para catequina, 30-150 µg/ml para epicatequina, 150-800 µg/ml para EGCG, 20-105 µg/ml para galato de galocatequina e 40-205 µg/ml para ECG ($r > 0,9999$ para todos os compostos). Foi, também, avaliada a atividade antioxidante *in vitro* através do método fotocolorimétrico do DPPH* e do método enzimático da hipoxantina/xantina oxidase. Todos os sistemas de extração testados e seus respectivos extratos liofilizados apresentaram rendimento superior a 30%, sendo que o melhor sistema teve rendimento médio de 36,29%, e se mostrando mais eficiente na extração de EGCG e ECG. As amostras do verão apresentaram melhor atividade antioxidante em comparação às da primavera. Os teores dos componentes ECG e EGCG foram os únicos que correlacionaram com a atividade antioxidante *in vitro* (DPPH*). A análise estatística não mostrou diferença significativa ($\alpha = 0,05$) nos teores de catequinas totais entre as estações primavera e verão.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, chá-verde brasileiro, validação, CLAE, extrato liofilizado, atividade antioxidante, catequinas, cafeína.

ABSTRACT

Components study and antioxidant activity evaluation of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar)

The Brazilian green tea, produced from *Camellia sinensis* var. *assamica*, have been cultivated in Brazil recently because the rise at its consumption. The main pharmacological activities attributed to this plant are related to antioxidant activity as chemopreventive and anti-cancer agent. Herein, a new HPLC method was developed and validated to evaluate the profile of the major Brazilian green tea constituents [epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin, caffeine, epicatechin gallate (ECG) and epicatechin] between spring and summer, using different extraction systems. The response was linear over a range of 37-185 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for caffeine, 99-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for epigallocatechin, 20-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for catechin, 30-150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for epicatechin, 150-800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for EGCG, 20-105 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for galocatechin gallate and 40-205 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for ECG ($r > 0.9999$ for all compounds). Likewise, the *in vitro* antioxidant activity was evaluated using DPPH[•] assay and hipoxanthine/xanthine oxidase assay. The extractors systems to produce the freeze-drying extract had presented yield up of 30%. The best system an average yield of 36.26% showed more efficient to extract EGCG and ECG. The summer samples presented better antioxidant activity when compared with spring samples. Only ECG and EGCG contents presented correlation with *in vitro* antioxidant activity (DPPH[•] assay). The statistic analysis did not show significant difference ($\alpha = 0.05$) in total catechin content between spring and summer seasons.

KEY WORDS: *Camellia sinensis*, Brazilian green tea, validation, HPLC, freeze-drying extract, antioxidant activity, catechins, caffeine.

1. INTRODUÇÃO

A palavra chá, que no Brasil tem conotação de bebida feita a partir de infusão ou decocção de vegetais, tem no oriente (por exemplo: Japão) a atribuição ao nome popular de *Camellia sinensis* desde tempos remotos. Este fato foi observado pela existência de um *kanji* (ideograma chinês) próprio para planta. Neste trabalho, a palavra “chá” será usada de forma semelhante ao oriente, ou será, quando necessário, indicado o tipo de chá (preto, verde, etc.).

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água. Sendo também umas das maiores fontes alimentares de flavonóides (RIJKEN *et al.*, 1996).

O chá-verde é um produto obtido a partir de *Camellia sinensis* em que suas folhas e brotos recebem tratamento térmico para inativação de suas enzimas (em especial as polifenolases) após sua colheita seguido de “enrolagem” (*rolling*) ou “fragmentação” (*comminution*) e secagem (KIRK-OTHMER,1983; BRUNETON, 1996; SABU *et al.*, 2002). Esta estabilização por tratamento térmico preserva os polifenóis encontrados naturalmente na planta fresca. Muitos destes, em especial as catequinas, têm se destacado no meio científico por apresentarem atividades antioxidante, quimiopreventiva, anticarcinogênica, antiinflamatória, antilipêmica (RIJKEN *et al.*, 1996; SATO e MIYATA, 2000; GOSSLAU e CHEN, 2004), antidiabética (ANDERSON e POLANSKY, 2002; SABU *et al.*,2002), antimicrobiana (HAMILTON-MILLER, 1995 e 2001) e antiviral (KAWAI *et al.*, 2003).

O cultivo da *Camellia sinensis* no Brasil está mais restrito ao Vale do Ribeira-SP por possuir condições climáticas mais favoráveis. Suas colheitas são feitas de agosto a maio, com apenas dois meses de interrupção que normalmente ocorre nos meses de junho e julho, após a sua poda, antes do inverno. O intervalo entre colheitas é de 7 a 10 dias em pleno verão (janeiro) chegando a 20 ou mais dias em agosto (IAC-CIIAGRO, 2005). O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) desenvolveu dois cultivares de chás catalogados como IAC-250 e IAC-259 (1968), sendo que este último possui como característica a alta produtividade (IAC, 2005).

Muitos fatores podem influenciar de forma significativa a composição do chá, como sua variedade, estação em que foi colhido, idade da folha, clima e técnicas de

cultivo (PERVA-UZUNALIC *et al.*, 2005). Assim sendo, chás cultivados em diferentes áreas geográficas apresentarão diferenças significativas na sua composição química (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2003), o que pode ser aplicado aos teores de catequinas, cafeína e minerais no chá-verde. Também, os teores de catequinas em extratos dependem principalmente da tecnologia utilizada na extração, método de concentração e conservação (BONOLI *et al.*, 2003).

Os polifenóis do chá-verde e do chá-preto têm importante valor na indústria alimentícia e também para uso medicinal (PAN *et al.*, 2003), surgindo recentemente mais e mais aplicações para os extratos de chá. Com o aumento na demanda de extratos de chás surge a necessidade de métodos para controle de qualidade na determinação de catequinas tanto em extratos como na matéria-prima (WANG *et al.*, 2000).

Considerando-se que o consumo do chá-verde brasileiro tem aumentado em nosso País, cabe destacar a importância da análise referente à composição química e à sua atividade antioxidante da planta cultivada em solo nacional, tendo em vista as diferenças edáficas (tipo e composição do solo) e climáticas existentes, visto que somente há estudos sobre as atividades terapêuticas e os teores de catequinas nos chás importados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a composição química e a atividade antioxidante do chá-verde brasileiro, produzido a partir da variedade *assamica* (cultivar IAC-259) cultivada no Vale do Ribeira, SP.

2.2 Objetivos específicos:

- Propor método de extração para produção de extrato de chá-verde brasileiro com melhor relação galato de epigallocatequina (EGCG)/cafeína;

- Desenvolver método analítico por CLAE e validá-lo para controle de qualidade da decocção e extratos de chá-verde;

- Verificar a composição de extratos de chá-verde brasileiro obtidos por diversos sistemas de extração;

- Comparar os teores de catequinas das amostras de chá-verde brasileiro colhidas no verão/primavera com a de alguns chás importados, através de CLAE;

- Testar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos desenvolvidos, assim como de seus componentes majoritários.

3. REVISÃO

3.1 Descrição da planta

A *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze é uma pequena árvore, muito ramosa, pertencente à família *Theaceae* (*Ternstroemiaceae*) originária do oriente. Seu habitat natural é ao sul do rio Yangtze e ao leste da Província Zhejiang na China até Assam-Burma ao oeste, incluindo Tailândia e Vietnã. Seu tamanho pode chegar de 1-6 metros de altura quando adulta com uma cobertura de 60 cm a 4 m de diâmetro (HUANG, 1993; BOWN, 1995; BRUNETON, 1996).

As folhas são verdes, incompletas, simples, glabras ou ligeiramente pubescentes na página inferior ao longo da nervura principal, normalmente coriáceas, penínervias, elípticas ou lanceoladas e de modo geral serrilhadas nas bordas; com filotaxia alterna e pecíolo pequeno. As suas folhas mais jovens e os gomos, parte da planta utilizada na produção de chá, são cobertos por um fino indumento branco e sedoso que mais tarde vem a desaparecer. É este indumento que origina o nome dado ao gomo terminal: *pekoe*, da palavra chinesa *pak-ko* que significa cabelo ou penugem (BOWN, 1995; BRUNETON, 1996; PDR, 2000; FERRARA *et al.*, 2001).

3.2 Constituição química

As folhas não fermentadas contém cerca de 15-25% de proteínas, 5% de glicídeos, 30% de polifenóis, 1-5% de alcalóides [cafeína 2,9-4,2% (Fig. 1), teofilina 0,02-0,04%, teobromina 0,15-0,2%], vitaminas: C, B₁, B₂ e K e minerais como flúor (130-160 mg/kg), potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês e fósforo entre outros (HUANG, 1993; BRUNETON, 1996; PDR, 2000; FERRARA *et al.*, 2001).

No chá-verde as catequinas representam 90% do total dos flavonóides - sendo que 20-30% das catequinas podem estar na forma oxidada - e 10% de flavonóis (RIJKEN *et al.* 1996; HIGDON e FREI, 2003). As catequinas totais perfazem de 20-30% do peso seco do chá (WANG *et al.*, 2000); dentre estes se destacam: galato de epigalocatequina (EGCG) de 1,2-18,8%, epigalocatequina (EGC) de 0,1-5,5%, epicatequina (EC) de 0,19-2% e traços (<0,08%) de catequina (PETERSON, *et al.*, 2005).

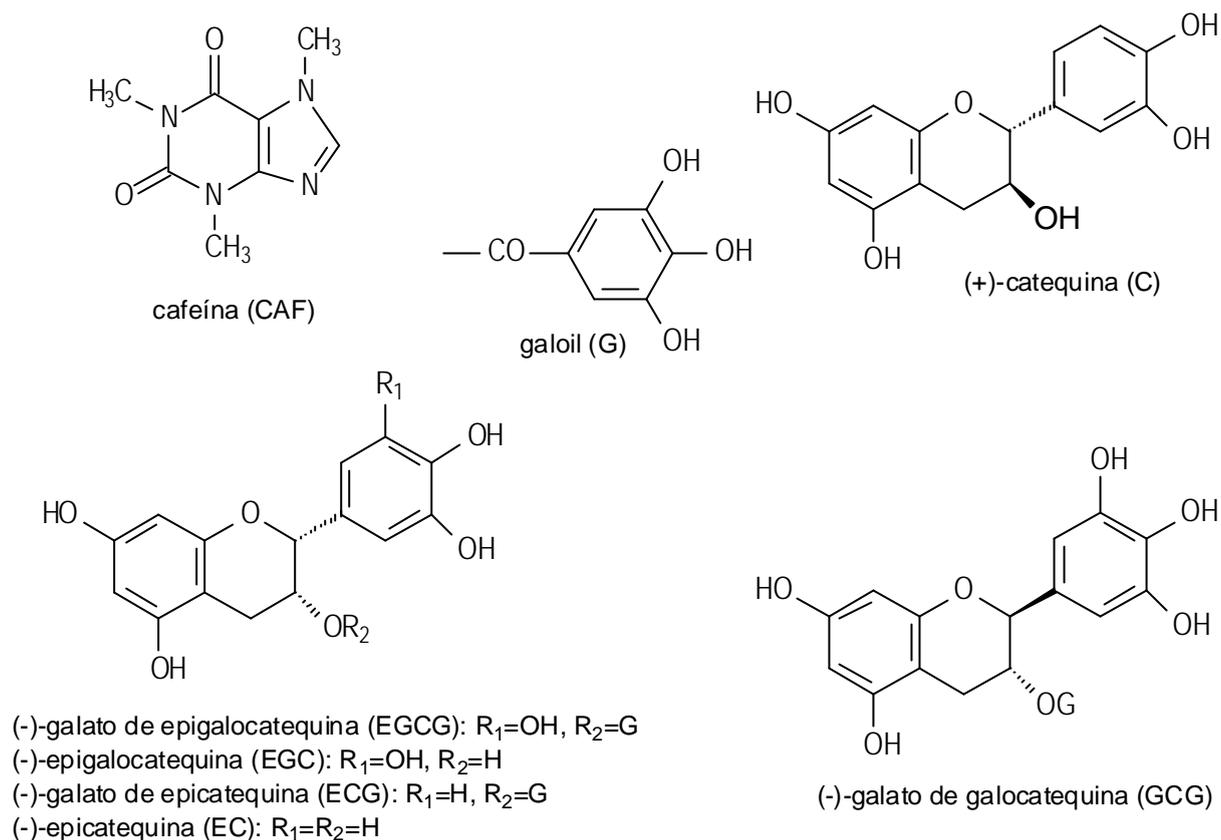


Figura 1 – Principais componentes presentes em *Camellia sinensis*.

A quantidade normalmente encontrada de polifenóis numa infusão de chá-verde é de aproximadamente 60 mg/g de folhas de chá, variando de 9 até 117 mg/g dependendo da procedência deste chá (DALLUGE e NELSON, 2000).

Ainda em relação à constituição química dos componentes do chá foram encontrados derivados do ácido caféico, como o ácido clorogênico, entre outros; também flavonóides insolúveis em água como quercetina, canferol e miricetina; e linalol como óleo volátil (PDR, 2000) e, também, um aminoácido encontrado nesta planta e em um tipo de cogumelo (*Xerocomus badius*): L-teanina (ácido γ -etilamino-L-glutâmico) que constitui cerca de 1-2% do peso seco das folhas do chá (JUNEJA *et al.*, 1999).

3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante tem sido ressaltada por diversos autores como sendo uma das principais propriedades farmacológicas do chá-verde (RIJKEN *et al.*, 1996).

Ratos alimentados com uma dieta rica em proteína (18% de caseína e 0,75% de adenina [p/p]), suplementados com uma mistura de catequinas ou EGCG, excretaram menor quantidade de metilguanidina na urina, que é um marcador indireto do dano renal pelo radical hidroxila (OH[•]). Num estudo em humanos, o consumo de um litro de chá por dia diminuiu a concentração de dialdeído malônico e 8-hidroxideoxiguanosina urinária, após consumir o chá por uma semana. E a suplementação de catequinas do chá-verde reduziu significativamente a concentração plasmática hidroperóxido de fosfatidilcolina após 60 minutos da ingestão (RIJKEN *et al.*, 1996).

TOIT e colaboradores (2001) compararam a atividade antioxidante de frutas, vegetais e chás mensurando seu equivalente em vitamina C, através do método fotolorimétrico que utiliza o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) para quantificar a capacidade seqüestradora de radical (RSC), e observaram que a atividade antioxidante de duas xícaras de chá-verde, na concentração de 120-140 µg/ml de catequinas, equivale à capacidade antioxidante de 400 mg de vitamina C.

Em estudo realizado com 45 amostras de vários tipos de chás (chá-preto, chá-vermelho¹ e chá-verde), comercializados na Espanha, propondo dosear os componentes que possuem atividade antioxidante como Cr, Mn, Se, Zn e catequinas, foi constatado que dentre os tipos de chás estudados o chá-verde é o que apresentou maiores quantidades de catequinas, especialmente galato de epigallocatequina (EGCG) e epigallocatequina (EGC) (CABRERA *et al.*, 2003).

Na Itália, a atividade antioxidante relativa do chá-verde e de outros chás disponíveis no mercado foi avaliada utilizando-se um método recentemente desenvolvido (biosensor da superóxido dismutase) onde se utiliza um eletrodo para

¹ Chá semi-fermentado conhecido na China como chá Oolong.

medir a atividade do catalisador (enzima) de forma indireta, quantificando o peróxido de hidrogênio formado durante a dismutação do radical superóxido que foi gerado durante a reação enzimática da hipoxantina/xantina oxidase. Neste ensaio foi obtido, em ordem decrescente, o seguinte resultado para atividade antioxidante: chá-verde > chá-preto com limão > chá-preto com pêsego > chá-preto com leite > chá-preto descafeinado > chá de camomila (CAMPANELLA, BONANNI e TOMASSETTI, 2003).

3.4 Atividade quimiopreventiva e antitumoral

Quimioprevenção é o uso de agentes químicos naturais ou sintéticos, incluindo suplementos nutricionais ou suplementos à base de ervas, para prevenir doenças, em oposição ao uso de quimioterápicos onde fármacos, na maioria, sintéticos, são usados para remover ou aliviar os sintomas das doenças. O conceito de quimioprevenção, embora usado no oriente por milhares de anos, não havia ganhado reconhecimento científico no ocidente até recentemente (GOSSLAU e CHEN, 2004).

A *American Association for Cancer Research* tem aceitado que a quimioprevenção é uma alternativa viável para o controle do câncer. Sugere-se que o mecanismo pelo qual os quimiopreventivos poderiam auxiliar no controle do câncer estão relacionados ao controle da apoptose celular. Isto poderia ser mediado mitocondrialmente pela ativação de fatores pró-apoptóticos como procaspases, citocromo C, Apaf-1, endonuclease-G e fator indutor de apoptose, após injúria celular (GOSSLAU e CHEN, 2004).

EGCG e outras catequinas do chá mostraram primeiramente serem apoptóticos em células humanas linfóides leucêmicas e células humanas de carcinoma. A dose de EGCG capaz de induzir a apoptose nestas células ficou entre 20 a 100 μM , e o tempo de curso variou de 10 a 30 h (GOSSLAU e CHEN, 2004).

O consumo diário de chá tem mostrado efeitos preventivos em relação às doenças crônicas causadas por fatores nutricionais e pelo cigarro. Em estudo realizado em ratos tratados com 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK),

uma nitrosamina do cigarro, verificou-se a supressão da formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), um marcador do dano oxidativo do DNA, assim como a inibição de desenvolvimento de câncer de pulmão em relação ao grupo controle, quando concomitantemente foram tratados com extrato do chá (WEISBURGER e CHUNG, 2002).

Estudos de *National Institute of Environmental Health Sciences*, da Universidade de Rochester, Nova Iorque, demonstraram que o EGCG e a epigallocatequina (EGC) presentes no chá-verde anulam a ação dos receptores aril-hidrocarboneto. Esse receptor é um fator de transcrição ligante-dependente que pode ser ativado por numerosos compostos sintéticos ou naturais de estrutura química diversa, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, indóis e flavonóides. Tem papel essencial na ativação de genes causadores de câncer, em ratos e também em células humanas (PALERMO *et al.*, 2003).

3.5 Atividade antidiabética

ANDERSON e POLANSKY (2002) verificaram em ensaio epididimal em células adiposas que o chá consumido normalmente (*sache* de 2 g infuso em 237 mL de água quente por 5 min.) potencializou a atividade da insulina, sendo que a maior atividade foi atribuída ao EGCG, seguido por ECG, taninos e teaflavinas.

As catequinas do chá têm mostrado serem capazes de inibir enzimas que hidrolisam carboidratos, inclusive a α -amilase. Uma mistura de catequinas de chá-verde se mostrou efetiva na supressão do aumento do nível de glicose e de insulina plasmática em ratos, após ingestão de carboidratos (ANDERSON e POLANSKY, 2002).

SABU e colaboradores (2002) avaliaram a atividade antidiabética, em ratos, nos quais o diabetes foi induzido por aloxano, e verificaram que após tratamento com polifenóis de chá-verde por 15 dias, estes apresentaram uma redução de 29 e 44%, respectivamente, nos níveis de glicose sérica quando tratados com 50 e 100 mg/kg de polifenóis. Devido ao aloxano produzir no animal radicais livres, o que causa a injúria no pâncreas, outros parâmetros relacionados ao estresse oxidativo

foram avaliados, entre eles: os níveis de superóxido dismutase (SOD), glutatona reduzida (GSH), catalase, peroxidação lipídica (LP) e glutatona peroxidase (GSH-Px) verificando que apenas os níveis de GSH e SOD aumentados. Consta na literatura (SABU *et al.*, 2002 e BABU *et al.*, 2006) que diabéticos têm seus níveis de GSH diminuídos e que o aumento dos níveis deste, com conseqüente inibição da LP, possa ser devido aos polifenóis do chá-verde.

3.6 Outras atividades farmacológicas

HAMILTON-MILLER (1995) relatou estudo feito por TODA e colaboradores. (1989)² em que foi verificado que o extrato de chá foi bacteriostático ou bactericida frente bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* e *Vibrio* spp. Mais tarde estes mesmos pesquisadores³ verificaram que uma concentração idêntica a encontrada na bebida (em torno de 3 mg/ml em resíduo seco) inibiu crescimento de *S. aureus* oxacilina resistente.

O uso de chá-verde pode ser benéfico na prevenção de cáries (PDR, 2000). Isto é sugerido devido ao efeito bactericida sobre *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, prevenção da aderência da bactéria no dente, inibição da glicosil transferase e inibição das amilases bacterianas e humanas (HAMILTON-MILLER, 2001).

Cientistas da Universidade de Tóquio, Japão, descobriram que o EGCG impede que as proteínas do VIH-1 se conectem nas moléculas CD4 das células *T-helper* que é o primeiro passo da infecção pelo VIH. Isto poderia ser muito útil para a criação de novos medicamentos para o tratamento da SIDA, baseados em modelos moleculares do EGCG (KAWAI *et al.*, 2003; NANCE e SHEARER, 2003).

² TODA, M.; OKUBO, S.; HYOSHI, R.; SHIMAMURA, T. The bactericidal activity of tea and coffee, Lett. Appl. Microbiol., v.8, p.123-5, 1989 *apud* HAMILTON-MILLER, J.M.T. Minireview: Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.39, n.11, p.2375-7, 1995.

³ TODA, M.; OKUBO, S.; HYOSHI, R.; SHIMAMURA, T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Jpn. J. Bacteriol., v.46, p.839-45, 1991 *apud* HAMILTON-MILLER, J.M.T. Minireview: Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.39, n.11, p.2375-7, 1995.

3.7 Toxicidade, efeitos adversos e superdosagem

A suspensão da venda de extrato hidroalcoólico de chá-verde na França e na Espanha, por suspeita de hepatotoxicidade do mesmo, levou pesquisadores da Alemanha, França e Suíça a verificarem a toxicidade do extrato de chá-verde e seus constituintes em culturas de hepatócitos de ratos. Concluíram que o mesmo possui baixa toxicidade *in vitro* (SCHMIDT *et al.*, 2005).

Efeitos indesejáveis podem ocorrer em pessoas que possuem o estômago hipersensível principalmente devido ao ácido clorogênico e aos taninos. Hiperacidose, irritação gástrica, redução do apetite, assim como constipação ou diarreia, podem ocorrer com o intenso uso do chá. Mas estes efeitos indesejáveis podem ser geralmente evitados através da adição de leite ao chá (PDR, 2000).

Superdosagem, através da quantidade correspondente a 300 mg de cafeína, ou 5 xícaras de chá, podem levar à inquietação, tremor e aumento da excitabilidade reflexa, sendo os primeiros sinais de toxicidade: vômito e espasmo abdominal; entretanto não se consegue chegar a uma dose fatal apenas bebendo o chá (PDR, 2000).

3.8 Métodos de extração e de quantificação de componentes químicos

Vários métodos de extração têm sido propostos, visando a otimizar a extração de flavonóides e cafeína do chá (WANG *et al.*, 2000; ZUO *et al.*, 2002; PAN *et al.*, 2003; NISHITAMI e SAGESAKA, 2004; YAO *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2005; PERVA-UZUNALIC *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2007).

PAN e colaboradores (2003), estudando quatro sistemas de solventes e quatro tipos de extração, concluíram que a extração assistida por microondas, seguida por ultra-som, foi a que extraiu maiores quantidades de polifenóis e cafeína. PERVA-UZUNALIC e colaboradores (2005) obtiveram máxima eficiência de extração em água quando as folhas foram extraídas a 80 °C por 20-30 minutos quando comparados a outras temperaturas de extração (60, 70, 85, 95 e 100 °C) e entre diferentes tempos de extração (0 – 240 min). Também foi observado por estes

autores que entre 35 a 60 minutos a eficiência da extração, em 80 °C, caía abruptamente.

Entre os solventes orgânicos utilizados na literatura que foram considerados eficientes para a extração do chá pode-se mencionar acetona, metanol, etanol e acetonitrila usados normalmente em mistura com água. Destes, a acetonitrila é usada apenas para soluções extratoras com fins de análise da composição da planta, não sendo usada para produção de extratos (GOTO *et al.*, 1996; ZUO *et al.*, 2002 e PAN *et al.*, 2003). Técnicas mais recentes como extração assistida por ultrassom, extração líquida pressurizada, extração assistida por microondas, extração por fluido supercrítico e extração por água supercrítica têm sido empregadas visando a diminuir o tempo de extração, bem como a quantidade de solvente empregado (HAWTHORNE *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2003; PÉRES *et al.*, 2006).

Análises utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e Eletroforese Capilar (EC) são as técnicas mais citadas para separação, identificação e quantificação de catequinas, sendo a cromatografia líquida em fase reversa com detecção UV o método de escolha utilizado por vários autores (GOTO *et al.*, 1996; BRONNER e BEECHER, 1998; DALLUGE e NELSON, 2000; ZUO *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2005).

Os trabalhos consultados utilizam em geral CLAE com coluna C-18 em fase reversa e detecção por UV. HOEFLER e COGGON (1976)⁴ descreveram pela primeira vez o método pelo qual haviam identificado cinco catequinas (C, EGC, EC, EGCG e ECG) diretamente da infusão de chá-verde. Sua separação foi pobre em resolução, mas representou um significativo avanço em relação à identificação e doseamento das catequinas do chá-verde. Desde este experimento, até em torno de 1996, não houve muito avanço no método de doseamento até que GOTO e colaboradores (1996) desenvolveram um método capaz de separar oito catequinas contidas naturalmente no chá, utilizando CLAE com coluna C-18 de fase reversa. Este método utilizou um gradiente com a fase móvel composta por água, acetonitrila e ácido fosfórico, onde a concentração de cada componente era modificada em

⁴ HOEFLER, A.C.; COGGON, P. *Journal of Chromatography*, v.129, p.460, 1976 *apud* DALLUGE, J.J.; NELSON, B.C. Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, v.881, p.411-24, 2000.

relação ao tempo total de análise, sendo necessário o controle da temperatura. Com este estudo foi possível verificar que em 85 amostras comercialmente disponíveis, as 4 catequinas de maior concentração no chá eram EGC, EGCG, EC e ECG (GOTO *et al.*, 1996).

Na Tabela 1 encontra-se um resumo dos métodos por CLAE, utilizados para determinação simultânea de componentes, em especial as catequinas, do chá-verde.

Tabela 1 – Resumo dos métodos utilizados para determinação simultânea de componentes do chá-verde por cromatografia líquida de alta eficiência.

COMPOSTOS	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO	AUTOR
Ac. gálico; (+)-GC; (-)-EGC; (+)-C; CAF; (-)-EGCG; (-)-EC; (-)-GCG; (-)-ECG	Kingsorb [®] C-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	MeOH: H ₂ O: ác. ortofosfórico (20:79,9:0,1 V/V)	Ultravioleta em 210 nm	Wang <i>et al.</i> , 2000
CAF; (-)-EGCG; (-)-EGC; (+)-C; (-)- EC; (-)-ECG	Cosmosil [®] 5C18- MS (250 x 4,6 mm, 5µm)	MeOH: H ₂ O: ác. fórmico (19,5: 82,5: 0,3 V/V)	Ultravioleta em 280 nm	Lin <i>et al.</i> , 2003
(-)-EGCG; (-)-EGC; (-)-ECG; (-)-EC; (-)- GCG; (-)-GC; (-)-CG; (+)-C	Wakosil-II [®] 5C18 HG (150 x 3,0 mm, 5 µm)	(A) H ₂ O: MeOH: ác. fosfórico (85:15:0,1 V/V) (B) H ₂ O: MeOH: EtOAc: ac. fosfórico (85: 15: 1: 0,1 V/V)	Ultravioleta em 280 nm	Nishitami e Sagesaka, 2004
(+)-C; (-)-EC; (-)- EGC; (-)-EGCG; (-)- ECG; CAF; AG; teobromina; teofilina	Lichrocart [®] C-18 (250 x 4,0 mm, 5 µm)	(A) ACN (B) água ácida (ác. ortofosfórico 0,1%)	Ultravioleta em 210 nm	Sharma <i>et al.</i> , 2005
CAF; (-)-EGC; (+)-C; (-)-EC; (-)-EGCG; (-)-ECG	XTerra [®] C-18 (100 x 3,9 mm, 3,5 µm)	(A) H ₂ O: ACN: TFA (919:80:1 V/V) (B) H ₂ O:ACN:MeOH: TFA (699:270:30:1 V/V)	Ultravioleta em 280 nm	Neilson <i>et al.</i> , 2006
CAF; (+)-C; (-)-EC; (-)-EGCG	Lichrosorb [®] C-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	H ₂ O: MeOH: ACN: EtOAc: ác. acético glacial (89:6:1:3:1 V/V)	Ultravioleta em 280 nm	Saito <i>et al.</i> , 2006

DALLUGE e colaboradores (1998) em estudo de reprodutibilidade das metodologias descritas na literatura para separação das quatro principais catequinas (EGC, EC, EGCG e ECG) verificaram que muitas não eram reprodutíveis, quando modificados alguns parâmetros de coluna como as suas especificações (tipo e formato da sílica) e o fabricante.

3.9 Métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Muitos dos estudos de atividade antioxidante *in vitro* de compostos específicos ou de extratos são conduzidos utilizando o radical estável DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Fig. 2) em solução metanólica (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; TOIT *et al.*, 2001; TREVISAN *et al.*, 2006; CHAN, LIM e CHEW, 2007).

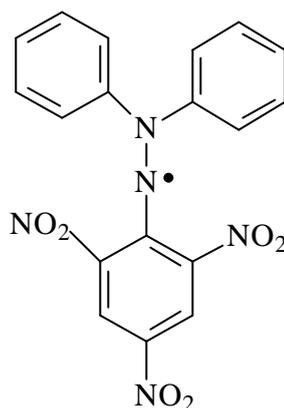
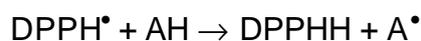


Figura 2 - Estrutura molecular do radical DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) PM 394,3 (BRAND-WILLIAMS, 1995).

Esta técnica se baseia na quantificação do DPPH[•] pela sua absorvidade molar entre 515-517 nm na forma de radical. Quando o DPPH[•] é reduzido, seja por um antioxidante ou por outro radical, esta absorção se extingue sendo proporcional a sua concentração, conforme mostrado na equação:



Esquema da reação radicalar do DPPH[•] sendo reduzido por (AH) antioxidante ou outro radical livre (R[•]) (BRAND-WILLIAMS, 1995)

OWEN e colaboradores (1996) desenvolveram método por CLAE para quantificação da formação de radicais hidroxila pela determinação de ácidos dihidroxibenzóicos, utilizando o sistema enzimático hipoxantina/xantina oxidase. Este sistema é conhecido por produzir o íon superóxido e peróxido de hidrogênio durante a hidroxilação da hipoxantina (Fig. 3). Quando o ferro quelado é incluído neste sistema, o superóxido reduz o ferro III para ferro II e o ferro II-quelado também reage com o peróxido de hidrogênio para formar o altamente reativo radical hidroxila (OH[•]). Na técnica por CLAE, se utiliza o par iônico hidróxido de tetrabutilamônio como reagente e o ácido salicílico como composto aromático apropriado para a quantificação dos radicais hidroxilas. Neste sistema, os principais produtos resultantes são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico e o ácido 2,3-dihidroxibenzóico na proporção de 5:1.

Outro método proposto para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, se baseia na quantificação, por CLAE, de derivados hidroxilados do ácido salicílico obtidos após o ataque de espécies reativas de oxigênio (ERO), quando adicionados na amostra os reagentes hipoxantina/xantina oxidase e Ferro III em tampão fosfato pH = 6,5 (OWEN, 2000).

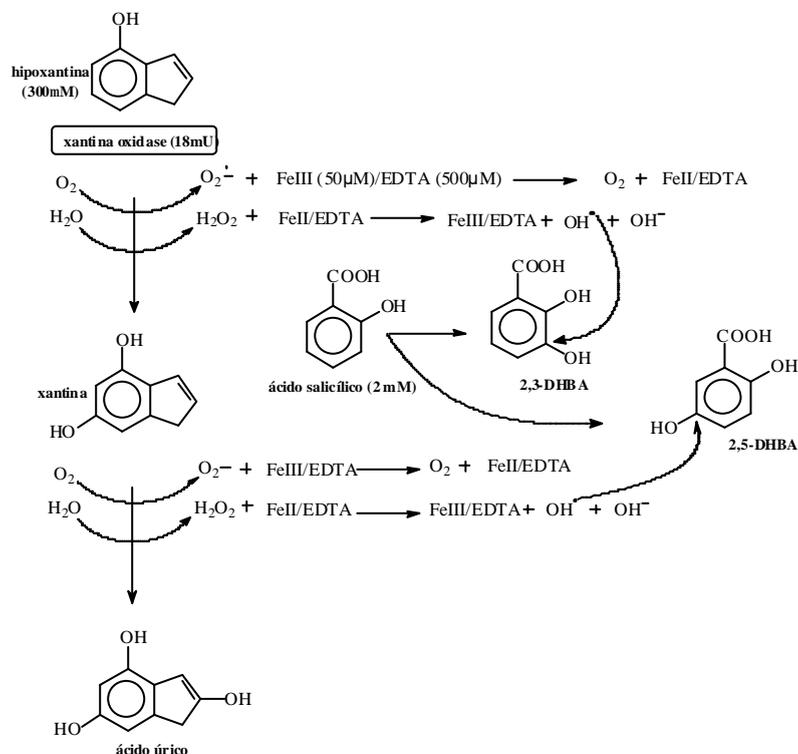


Figura 3 – Esquema da geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) no sistema hipoxantina/xantina oxidase (OWEN *et al.*, 2000).

No Brasil ainda existem poucos estudos feitos com *Camellia sinensis*. SAKAI (1997) pesquisou em sua tese de doutorado a influência da adubação NPK em culturas de chá no Vale do Ribeira, SP. Em trabalho de dissertação, o teor de flúor nos chás industrializados de *Camellia sinensis* no Brasil foi avaliado, verificando-se que este se assemelhava aos da literatura, concluindo que isto poderia ter um significado positivo na saúde bucal de seus consumidores (SANTORO e GUIMARÃES, 1997). SILVA (2003) avaliou em sua dissertação, a influência da extração assistida por ultra-som na determinação de Al, Ca, Mg e Mn em chás: *Ilex paraguariensis*, *Camellia sinensis* e *Cymbopogon citratus*. SAITO e colaboradores (2006) desenvolveram um método para quantificação de EGCG, EC, C e CAF em chás colhidos em diversas estações do ano (primavera, verão e outono) no Vale do Ribeira, porém este trabalho careceu de doseamentos de outras catequinas importantes no chá-verde como o ECG e EGC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias químicas, reagentes e equipamentos

As substâncias de referência para validação do método analítico por CLAE, bem como para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* foram adquiridas, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Especificações das substâncias químicas utilizadas.

Substância	Pureza	Procedência	Lotes
ácido ascórbico p.a.	99,7%	Merck	5199238
ácido etilenodiaminotetracético (Titriplex [®])	NI	Merck	9748259
ácido gálico	NI	Merck	K18362930
ácido salicílico p.a.	99,8%	Vetec	950408
cafeína anidra p.a.	99,9%	Nuclear	01071211
(+)-catequina	98%	Sigma	072K1568
cloreto férrico p.a.	97-102%	Synth	50966
2,2-difenil-1-picrilidrazila	90%	Sigma	51K1419
(-)-epicatequina	NI	Sigma	072K2630
(-)-epigallocatequina	98%	Sigma	104K0963 085K1630
fosfato de potássio dibásico p.a.	98%	Vetec	047785
fosfato de potássio monobásico p.a.	99%	Merck	6390744
(-)-galato de epicatequina	98%	Sigma	054K1530 035K1468
(-)-galato de epigallocatequina	95%	Sigma	084K1719
(+)-galato de galocatequina	98%	Sigma	104K1020 035K1396
hipoxantina	NI	Sigma	042K0978
xantina oxidase (0,5 U/mg de proteína)	NI	Sigma	075K0325

Os solventes para extração foram de grau p.a., Vetec[®] (metanol), Nuclear[®] (etanol, acetona), água desmineralizada pH 5,0-6,0 e os de grau CLAE, Merck[®] (metanol), Vetec[®] (acetato de etila) e água obtida por sistema Milli-Q[®] Plus (Millipore[®]).

Foi utilizado para extração assistida por ultra-som sonicador Thornton modelo T50. A centrifugação dos extratos foi feita em centrífuga Janetzki K23. Para

concentração e extração da parte orgânica do extrato líquido utilizou-se evaporador rotatório Büchi modelo R-114 com banho-maria modelo B-480. Para produção do extrato liofilizado utilizou-se liofilizador modular Edwards modelo Modulyo 4K. Para pesagem das substâncias químicas de referência utilizou-se balança analítica SARTORIUS® modelo MC410S e para pesagem das amostras e reagentes, utilizou-se balança analítica OHAUS® modelo AS200. As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu LC-10AD vp, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A vp, central de controle SCL-10A vp, desgaseificador DGU-14A. As análises por espectrofotometria foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-1602PC. Para realização do ensaio enzimático utilizou-se termoagitador Eppendorf modelo *termomixer* 5437. A centrifugação dos micro-tubos da reação enzimática para avaliação da atividade antioxidante foi feita em centrífuga Eppendorf modelo 5415.

4.2 Matéria vegetal

O chá-verde brasileiro processado (estabilizado e seco) foi obtido junto aos produtores do Vale do Ribeira-SP que cultivam a *Camellia sinensis* var. *assamica* (cultivar IAC-259) e foi coletado nas estações de primavera e verão entre 2005 e 2006.

Tabela 3 – Datas das colheitas do chá-verde brasileiro e seu respectivo código.

Safra	Data da Colheita	Código
Primavera	05/10/2005	CVB-P1
	17/10/2005	CVB-P2
	05/11/2005	CVB-P3
Verão	01/02/2005	CVB-V1
	16/01/2006	CVB-V2
	01/03/2006	CVB-V3

Também foram ensaiadas duas amostras comerciais de chá-verde importadas, procedentes do Japão e 3 amostras comerciais nacionais. Todas obtidas no mercado local.

Tabela 4 – Código, procedência e descrição das amostras comerciais.

Código	Procedência	Descrição
ACN1	São Miguel Arcanjo, SP	Chá-verde nacional tipo banchá torrado
ACN2	Taquara, RS	Chá-verde nacional sem especificação
ACN3	Nova Santa Rita, RS	Chá-verde nacional sem especificação
ACI1	Shizuoka, Japão	Chá-verde importado tipo senchá ⁵
ACI2	Kioto, Japão	Chá-verde importado tipo banchá ⁶ (com mais talos e galhos)

4.3 Obtenção do extrato liofilizado

4.3.1 Obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 1

Para obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 1, pesaram-se 2,5 g de chá-verde, previamente moído em moinho-de-facas, em erlenmeyer e adicionaram-se 100 ml de água aquecida a 80 °C e manteve-se sob agitação mecânica por 20 minutos em chapa de aquecimento, com variação de temperatura de ± 2 °C.

Em seguida, a solução foi centrifugada em 3500 rpm (2000 g) por 5 min; o sobrenadante foi filtrado a vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com 5 ml de água. O filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20 °C para liofilização.

Após serem liofilizados, os extratos foram pesados e armazenados em dessecador, protegido da luz, até serem analisados por CLAE.

Codificaram-se os extratos da seguinte forma:

- ✓ ECVB-V1A - Extrato liofilizado de CVB-V1 e obtido pelo sistema 1;
- ✓ ECVB-V2A - Extrato liofilizado de CVB-V2 e obtido pelo sistema 1;
- ✓ ECVB-V3A - Extrato liofilizado de CVB-V3 e obtido pelo sistema 1;
- ✓ ECVB-P1A - Extrato liofilizado de CVB-P1 e obtido pelo sistema 1;

⁵ Chá mais popular do Japão. Feito dos brotos e das folhas mais tenras a cada rebento.

⁶ Chá feito da segunda colheita após terem sido colhidas as brotações para fazer o senchá.

- ✓ ECVB-P2A - Extrato liofilizado de CVB-P2 e obtido pelo sistema 1;
- ✓ ECVB-P3A - Extrato liofilizado de CVB-P3 e obtido pelo sistema 1;
- ✓ EACN1A – Extrato liofilizado de amostra comercial nacional (marca 1) e obtido pelo sistema 1;
- ✓ EACN2A – Extrato liofilizado de amostra comercial nacional (marca 2) e obtido pelo sistema 1;
- ✓ EACN3A – Extrato liofilizado de amostra comercial nacional (marca 3) e obtido pelo sistema 1;
- ✓ EACI1A – Extrato liofilizado de amostra comercial importada (marca 1) e obtido pelo sistema 1;
- ✓ EACI2A – Extrato liofilizado de amostra comercial importada (marca 2) e obtido pelo sistema 1.

4.3.2 Obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 2

Para obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 2, pesaram-se 5 g de chá-verde brasileiro em erlenmeyer e adicionaram-se 100 ml água-acetona (1:1, V/V) e submeteu-se a banho de ultra-som por 30 minutos.

Em seguida, procedeu-se do mesmo modo que para o sistema 1.

Após serem liofilizados, os extratos foram pesados e armazenados em dessecador, protegido da luz, até serem analisados por CLAE.

Codificaram-se os extratos da seguinte forma:

- ✓ ECVB-V1B - Extrato liofilizado de CVB-V1 e obtido pelo sistema 2;
- ✓ ECVB-V2B - Extrato liofilizado de CVB-V2 e obtido pelo sistema 2;
- ✓ ECVB-V3B - Extrato liofilizado de CVB-V3 e obtido pelo sistema 2;
- ✓ ECVB-P1B - Extrato liofilizado de CVB-P1 e obtido pelo sistema 2;
- ✓ ECVB-P2B - Extrato liofilizado de CVB-P2 e obtido pelo sistema 2;
- ✓ ECVB-P3B - Extrato liofilizado de CVB-P3 e obtido pelo sistema 2;

4.3.3 Obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 3

Para obtenção do extrato liofilizado pelo sistema 3, pesaram-se 5 g de chá-verde brasileiro em erlenmeyer e adicionaram-se 100 ml água-etanol (75:25 V/V) e colocou-se em banho de ultra-som por 30 minutos.

Em seguida, procedeu-se do mesmo modo que para o sistema 1.

Após serem liofilizados, os extratos foram pesados e armazenados em dessecador, protegido da luz, até serem analisados por CLAE.

Codificaram-se os extratos da seguinte forma:

- ✓ ECVB-V1C - Extrato liofilizado de CVB-V1 e obtido pelo sistema 3;
- ✓ ECVB-V2C - Extrato liofilizado de CVB-V2 e obtido pelo sistema 3;
- ✓ ECVB-V3C - Extrato liofilizado de CVB-V3 e obtido pelo sistema 3;
- ✓ ECVB-P1C - Extrato liofilizado de CVB-P1 e obtido pelo sistema 3;
- ✓ ECVB-P2C - Extrato liofilizado de CVB-P2 e obtido pelo sistema 3;
- ✓ ECVB-P3C - Extrato liofilizado de CVB-P3 e obtido pelo sistema 3;

4.4 Obtenção da amostra através da decocção assistida

Para o preparo da amostra através de decocção assistida, pesaram-se 2,5 g de chá-verde, previamente moído em moinho-de-facas, em erlenmeyer e adicionaram-se 100 ml de água Milli-Q[®] aquecida a 80 °C e manteve-se sob agitação mecânica por 20 minutos em chapa de aquecimento com variação de temperatura de ± 2 °C.

Em seguida, a solução foi centrifugada em 3500 rpm (2000 g) por 5 min; o sobrenadante foi filtrado a vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com 5 ml de água Milli-Q[®]. Adicionaram-se 200 µl de ácido acético glacial para estabilizar as catequinas e completou-se o volume até 100 ml com água Milli-Q[®]. Diluiu-se a amostra na proporção de 1:1 do decocto com água Milli-Q[®].

4.5 Determinação simultânea das catequinas e cafeína em chá-verde brasileiro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.1 Condições do sistema

4.5.1.1 Condições cromatográficas

Cada solução foi filtrada por membrana hidrofílica 0,22 μm e injetada em triplicata no cromatógrafo seguindo as condições cromatográficas descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições experimentais do método isocrático por CLAE.

Característica	Descrição
Fase Móvel	H ₂ O pH 2,25 \pm 0,03: MeOH: AcOEt (850:130:22,5 V/V)
Coluna	fase reversa C-18 Gemini [™] Phenomenex (150 x 4,6 mm DI, partícula esférica de 5 μm , poro 110 ?)
Fluxo da fase móvel	1,7 ml/min.
Comprimento de onda	280 nm
Volume de injeção	20 μl
Temperatura de análise	25 \pm 3 $^{\circ}\text{C}$

4.5.1.2 Fase móvel (FM) e solução de diluição (SD)

A fase móvel foi preparada acidificando a água ultrapura (Milli-Q[®]) com ácido fosfórico até pH 2,25 \pm 0,03; sendo que 850 ml desta solução aquosa foram misturados com 130 ml de metanol e 22,5 ml de acetato de etila, constituindo, assim a fase móvel. Utilizou-se a fase móvel como diluente (SD) para as substâncias químicas de referência (SQR) e os extratos.

4.5.1.3 Decoctos de chá-verde

Para análise dos decoctos de chá-verde, utilizou-se as mesmas condições cromatográficas descritas para os extratos secos, item 4.5.1.1. Filtrou-se a amostra em membrana 0,22 μm antes de ser injetada no cromatógrafo.

4.6 Validação da metodologia CLAE-DAD

Para a validação da metodologia desenvolvida por CLAE-DAD foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, especificidade (pureza do pico), robustez, limite de detecção e de quantificação. A precisão e a exatidão do método foram avaliadas utilizando soluções diluídas de extratos de chá-verde, enquanto que a linearidade, o limite de detecção e o limite de quantificação foram determinados utilizando solução da mistura das SQR.

A especificidade foi avaliada através da análise de pureza de cada pico da amostra utilizando detector de arranjo de diodos (DAD) e confirmando através dos tempos de retenção de cada SQR.

Foram também avaliados os parâmetros para adequabilidade do sistema cromatográfico.

4.6.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foram avaliados os parâmetros de repetibilidade das injeções, eficiência da coluna (N), resolução (Rs), fator de retenção (k') e fator de cauda (T).

A repetibilidade das injeções foi verificada nas soluções contendo a mistura das SQR utilizada para precisão intra-dia, preparadas conforme descrito no item 4.6.2.1. Foram calculados os desvios padrão relativos (DPR) dos tempos de retenção e das áreas absolutas dos cromatogramas para cada analito. Foram também avaliados, nessas soluções, os parâmetros de N, Rs, k' e T.

Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram efetuados com três replicatas de injeções, tanto para solução de referência como para a solução amostra.

Os critérios para aceitação dos resultados obtidos nos ensaios para adequabilidade do sistema cromatográfico, foram os preconizados (BRASIL, 2003;

USP 29; ICH Q2(R1), 2005) e os mesmos foram avaliados durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

4.6.2 Preparo das curvas-padrão

Para cada substância de interesse, construiu-se uma curva-padrão com cinco diferentes concentrações. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata ou até obtenção de um desvio padrão relativo aceitável, conforme as condições descritas no item 4.5.1.

A curva padrão de cada substância química de referência (SQR) foi realizada em três dias diferentes, e com as áreas médias dos cromatogramas obtidas nos diferentes dias, um gráfico foi construído para cada substância, plotando-se os resultados de área *versus* concentração ($\mu\text{g/ml}$). Foram calculados, para cada SQR, o coeficiente de correlação e a equação da reta da curva padrão. Esta, para cada substância, foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e validada pela análise de variância (ANOVA).

4.6.2.1 Preparo da mistura das substâncias químicas de referência

Para a obtenção de cada solução-mãe, foram pesados, separadamente, em balança analítica exatamente as seguintes quantidades das substâncias químicas de referência (SQR) 1,10 mg de ácido gálico (AG), 1,09 mg de catequina (C), 1,98 mg de cafeína (CAF), 1,65 mg de epicatequina (EC), 2,18 mg de galato de epicatequina (ECG), 5,28 mg de epigalocatequina (EGC), 8,31 mg de galato de epigalocatequina (EGCG) e 1,11 mg de galato de galocatequina (GCG). Diluíram-se, separadamente, as SQR pesadas em balão volumétrico de 10 ml, com a solução de diluição (SD).

Cada solução-mãe foi diluída em cinco diferentes concentrações que foram utilizadas na obtenção da respectiva curva-padrão, com o auxílio de micropipeta. A diluição e a concentração final de cada SQR estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração final de cada solução, em µg/ml, utilizadas para construção da curva padrão com 5 pontos.

Pontos		1	2	3	4	5
Volume da solução-mãe das SQR (µl)		300	700	900	1100	1500
Volume de diluente (SD) (µl)		1300	900	700	500	100
Concentração final (µg/ml)	ácido gálico (AG)	20,6	48,1	61,9	75,6	103,1
	catequina (C)	20,4	47,7	61,3	74,9	102,2
	cafeína (CAF)	37,1	86,6	111,4	136,1	185,6
	epicatequina (EC)	30,9	72,2	92,8	113,4	154,7
	galato de epicatequina (ECG)	40,9	95,4	122,6	149,9	204,4
	epigalocatequina (EGC)	99,0	231,0	297,0	363,0	495,0
	galato de epigalocatequina (EGCG)	155,8	363,6	467,4	571,3	779,1
	galato de galocatequina (GCG)	20,8	48,6	62,4	76,3	104,1

4.6.3 Preparo das amostras

As soluções-amostra foram preparadas pesando exatamente cerca de 50,0 mg dos extratos liofilizados e dissolvendo-os em balão volumétrico de 20 ml com solução de diluição (SD). Os balões foram submetidos a banho com ultra-som por 5 minutos e após as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm antes de serem injetadas no CLAE.

4.6.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela adição de quantidades conhecidas das SQR na amostra ECVB-V1A, de forma a obter a amostra acrescida de menor concentração e a amostra acrescida de maior concentração.

O ensaio para cada amostra acrescida (AA) foi realizado em dois dias diferentes, sendo cada uma analisada em triplicata, conforme condições descritas no item 4.5.1.

4.6.4.1 Preparo das soluções amostra e solução-mãe das substâncias químicas de referência.

Diluíram-se as substâncias químicas de referência em solução diluente (SD) de mesma composição da fase móvel, de forma a obter solução contendo

exatamente 110 µg/ml de ácido gálico, 109 µg/ml de catequina, 198 µg/ml de cafeína, 165 µg/ml de epicatequina, 218 µg/ml de galato de epicatequina, 528 µg/ml de epigalocatequina, 831 µg/ml de galato de epigalocatequina e 111 µg/ml de galato de galocatequina.

Para o preparo da solução de ECVB-V1A, foram pesados exatamente 100,1 mg do extrato em balão volumétrico de 20 ml e diluídos com solução de diluição para se obter a concentração de 5005 µg/ml.

Transferiram-se alíquotas de 1000 µl da solução de ECVB-V1A para seis tubos de ensaio de 5 ml. Separaram-se 2 tubos para amostra (A), dois tubos para amostra acrescida de menor concentração (AA₁) e dois tubos para amostra acrescida de maior concentração (AA₂). Nos tubos denominados A adicionaram-se 1,5 ml de SD com o auxílio de uma micropipeta. Nos tubos denominados AA₁ foram adicionados 1 ml de SD e 500 µl de solução-mãe de SQR's. Nos tubos denominados AA₂ foram adicionados 500 µl de SD e 1 ml de solução-mãe de SQR. Conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração final de cada componente, em µg/ml, presente nas soluções A, AA₁ e AA₂.

		Amostra (A)	AA₁	AA₂
Volume da solução de ECVB-V1A adicionado (µl)		1000	1000	1000
Volume de solução-mãe de SQR (µl)		0	500	1000
Volume de SD (µl)		1500	1000	500
Concentração final do extrato (µg/ml)		2002	2002	2002
Concentração final adicionado (µg/ml)	ácido gálico (AG)		22	44
	catequina (C)		21,8	43,6
	cafeína (CAF)		39,6	79,2
	epicatequina (EC)		33	66
	galato de epicatequina (ECG)		43,6	87,2
	epigalocatequina (EGC)		105,6	211,2
	galato de epigalocatequina (EGCG)		166,2	831
	galato de galocatequina (GCG)		22,2	44,4

4.6.5 Precisão

A precisão do método foi verificada na amostra ECVB-V1A através de nove ensaios completos, sendo realizados três ensaios por dia e analisados em triplicata. Da amostra ECVB-V1A, três alíquotas foram retiradas, contendo exatamente cerca de 40 mg e solubilizadas com a solução de diluição em balões volumétricos de 10, 15 e 20 ml, respectivamente. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm antes de serem analisadas por CLAE. Este procedimento foi realizado em três diferentes dias e os resultados foram expressos em desvio padrão relativo (DPR).

4.6.6 Especificidade

A especificidade foi determinada em todas as amostras analisadas, preparadas conforme item 4.6.3, através da determinação da pureza dos picos cromatográficos, com a utilização do equipamento descrito no item 4.1.

4.6.7 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção, para cada substância de interesse foi estimado calculando-se a partir dos dados obtidos da equação da reta da curva padrão, pela equação:

$$LD = \frac{[DP.3,3]}{b}$$

Onde:

DP = desvio padrão do intercepto

b = inclinação da reta

4.6.8 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação, para cada substância de interesse foi estimado calculando-se a partir dos dados obtidos da equação da reta da curva padrão, pela equação:

$$LQ = \frac{[DP.10]}{b}$$

Onde:

DP = desvio padrão do intercepto

b = inclinação da reta

4.6.9 Robustez

A robustez do método foi avaliada através das seguintes alterações:

- ✓ Variação do pH da fase móvel (pH 2,25 ? 2,30);
- ✓ Comprimento de onda de leitura (280 ? 275 nm).

4.7 Atividade antioxidante *in vitro*

4.7.1 Método fotolorimétrico do DPPH'

Todo o procedimento foi baseado nas técnicas descritas por BRAND-WILLIAMS e colaboradores (1995), TREVISAN e colaboradores (2006) e CHAN e colaboradores (2007) com pequenas modificações. A atividade antioxidante dos extratos de chá-verde foi determinada através do método de doseamento fotolorimétrico do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH'). Como substância antioxidante de referência, foi utilizado o ácido ascórbico. Todas as substâncias químicas de referência utilizadas nos doseamentos das amostras também foram testadas por este método.

Os extratos utilizados foram os descritos nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3.

Para construção da curva-padrão do DPPH', utilizaram-se soluções nas seguintes concentrações: 84,96; 127,44; 169,9 e 254,88 µM de 2,2-difenil-1-picrilidrazila.

Preparou-se cada solução amostra a partir dos diferentes extratos liofilizados de chá-verde, das amostras comerciais e das substâncias químicas de referência e em seguida, diluiu-se em metanol conforme as concentrações descritas nas Tabelas 8 a 12.

Tabela 8 – Concentrações finais ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas no estudo da atividade antioxidante *in vitro*, de cada substância de referência .

		ácido ascórbico	ácido gálico	catequina	epicatequina	epigalocatequina	galato de epicatequina	galato de epigalocatequina	galato de galocatequina
Solução-mãe ($\mu\text{g/ml}$)		34,67	32,32	31,2	32,96	31,4	32,2	31,2	32,4
DPPH [•] (250 μM)		1000 μl	1000 μl	1000 μl					
Volume final		1500 μl	1500 μl	1500 μl					
Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)	Ponto 1	2,31	1,08	2,08	1,10	2,09	2,15	1,04	2,16
	Ponto 2	4,62	1,62	4,16	3,30	4,19	4,29	2,08	4,32
	Ponto 3	6,93	2,15	6,24	4,39	6,28	6,44	4,16	6,48
	Ponto 4	9,24	3,23	8,32	7,69	8,37	8,59	6,24	8,64
	Ponto 5	11,55	4,31	10,4	9,89	10,47	10,73	*	*

* ponto não avaliado

Tabela 9 – Concentrações finais ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas no estudo da atividade antioxidante *in vitro*, de cada extrato liofilizado extraído pelo sistema 1.

		ECVB-V1A	ECVB-V2A	ECVB-V3A	ECVB-P1A	ECVB-P2A	ECVB-P3A
Solução-mãe ($\mu\text{g/ml}$)		99,20	96,64	101,76	32,96	31,4	97,28
DPPH [•] (250 μM)		1000 μl					
Volume final		1500 μl					
Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)	Ponto 1	6,61	6,44	6,78	6,19	5,03	6,49
	Ponto 2	9,92	9,66	10,18	12,37	7,55	9,73
	Ponto 3	13,23	16,11	13,57	15,47	10,07	12,97
	Ponto 4	16,53	19,33	16,96	18,56	12,59	16,21
	Ponto 5	19,84	*	20,35	*	15,10	19,46

* ponto não avaliado

Tabela 10 – Concentrações finais ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas no estudo da atividade antioxidante *in vitro*, de cada extrato liofilizado extraído pelo sistema 2.

		ECVB-V1B	ECVB-V2B	ECVB-V3B	ECVB-P1B	ECVB-P2B	ECVB-P3B
Solução-mãe ($\mu\text{g/ml}$)		64,00	64,96	64,32	64,32	69,44	71,36
DPPH [•] (250 μM)		1000 μl					
Volume final		1500 μl					
Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)	Ponto 1	2,13	4,33	2,14	4,29	4,63	4,76
	Ponto 2	6,40	6,50	6,43	6,43	6,94	7,14
	Ponto 3	8,53	8,66	8,56	8,58	9,26	9,51
	Ponto 4	14,93	10,83	14,98	10,72	11,57	11,89
	Ponto 5	*	12,86	*	12,86	13,89	14,27

* ponto não avaliado

Tabela 11 – Concentrações finais ($\mu\text{g/ml}$) utilizadas no estudo da atividade antioxidante *in vitro*, de cada extrato liofilizado extraído pelo sistema 3.

		ECVB-V1C	ECVB-V2C	ECVB-V3C	ECVB-P1C	ECVB-P2C	ECVB-P3C
Solução-mãe ($\mu\text{g/ml}$)		80,64	80,00	81,28	83,84	81,28	78,08
DPPH [•] (250 μM)		1000 μl					
Volume final		1500 μl					
Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)	Ponto 1	8,06	5,33	8,13	8,38	8,13	5,21
	Ponto 2	10,75	8,00	10,84	11,18	10,84	7,81
	Ponto 3	13,44	10,67	13,55	13,97	13,55	10,41
	Ponto 4	16,13	13,33	16,26	16,77	16,26	13,01
	Ponto 5	*	16,00	*	*	*	15,62

* ponto não avaliado

Tabela 12 – Concentrações finais (µg/ml) utilizadas no estudo da atividade antioxidante *in vitro*, de cada extrato liofilizado das amostras comerciais.

		EACN1A	EACN3A	EACI4A	EACI5A
Solução-mãe (µg/ml)		120,8	120,8	121,6	120,8
DPPH [•] (250 µM)		1000µl	1000µl	1000µl	1000µl
Volume final		1500µl	1500µl	1500µl	1500µl
Concentração final (µg/ml)	Ponto 1	8,05	8,05	8,11	8,05
	Ponto 2	12,08	12,08	12,16	12,08
	Ponto 3	16,11	16,11	16,21	16,11
	Ponto 4	20,13	20,13	20,27	20,13
	Ponto 5	24,16	24,16	24,32	24,16

Para avaliação da atividade antioxidante adicionaram-se 1000 µl da solução 250 µM de DPPH[•] em metanol a 500 µl das diferentes concentrações feitas a partir da diluição da solução-mãe das amostras. Deixou-se reagir em temperatura ambiente por 20 minutos em local protegido da luz. A concentração final de DPPH[•] ficou em 166 µM em cada tubo de ensaio.

Para o padrão de DPPH[•], utilizou-se metanol em lugar da solução-mãe do extrato de chá-verde. Todo o experimento foi feito em triplicata.

Foram calculadas as absorvâncias médias das triplicatas, através de espectrofotômetro em 515 nm, de cada amostra ou do padrão sendo quantificada a concentração de DPPH[•] remanescente, utilizando-se a equação:

$$\text{Concentração remanescente de DPPH}^{\bullet} \text{ (amostra)} = \frac{Aa \times Cp}{Ap}$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra tratada

Ap = absorvância do padrão de DPPH[•]

Cp = concentração do padrão de DPPH[•] em µM

A concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada em 100% é dita CE_{50} , sendo calculada por regressão linear das curvas construídas das concentrações das amostras testadas, onde a abscissa (x) representa a concentração da amostra e a ordenada (y) é a média de 3 análises do percentual de atividade antioxidante.

Os resultados também foram expressos como a quantidade equivalente em ácido ascórbico (QEAA) calculados conforme a seguinte equação:

$$QEAA_{(g)} = \frac{CE_{50(amostra)}}{CE_{50(ácido\ ascórbico)}} \times 1\ g$$

Onde:

CE_{50} (ácido ascórbico) = 6,54 $\mu\text{g/ml}$

CE_{50} (amostra) = valor obtido em $\mu\text{g/ml}$

4.7.2 Método enzimático do sistema hipoxantina/xantina oxidase

Este ensaio foi realizado em colaboração com grupo de pesquisa do Laboratório do Centro de Pesquisas em Ciências Médicas – ULBRA e Programa de Pós-Graduação em GT-ULBRA, através do Sistema de ensaio por padrões (*Standard assay system*), método proposto por OWEN e colaboradores (2000).

4.7.2.1 Preparo da solução reagente em tampão fosfato (pH 6,50)

A solução reagente para o ensaio enzimático foi elaborada em tampão fosfato (pH 6,5). Para o preparo de 500 ml de solução reagente utilizaram-se 19,05 ml de fosfato potássico dibásico (1 M); 30,95 ml de fosfato potássico monobásico (1 M); 73 mg de Titriplex[®]; 32,7 mg de cloreto férrico; 20,5 mg de hipoxantina e 125 mg de ácido salicílico.

4.7.2.2 Reação enzimática

A reação enzimática iniciou quando foram adicionados 4 µl de xantina oxidase (18 mU) em 1 ml da solução reagente em micro-tubos contendo extratos na faixa de 100-1200 µg do extrato liofilizado de chá-verde brasileiro ou com EGCG e AG na faixa de 0,25-4,00 µM e incubados em termoagitador a 37 °C por 3 horas.

Foram feitos controles negativos, sem adição da enzima, para avaliar interferentes na reação de produção de ácidos diidroxibenzóicos nas amostras tratadas.

4.7.2.3 Análise por CLAE-DAD

Após a reação enzimática, as amostras foram centrifugadas em 12000 rpm por 5 minutos em centrífuga para micro-tubos, e 20 µl do sobrenadante foram injetados em cromatógrafo a líquido nas condições cromatográficas descritas por OWEN e colaboradores (2000, 2003) e também conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.5.1, fazendo-se a leitura em 325 nm para os ácidos diidroxibenzóicos.

4.7.2.4 Apresentação dos resultados

Os resultados foram apresentados em porcentagem relativa na produção de ácidos diidroxibenzóicos, via reação radicalar, em comparação com a amostra sem tratamento (controle positivo).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos liofilizados

Os chás obtidos pela infusão, geralmente são submetidos a temperaturas em torno de 80-90 °C. Alguns autores relatam que a temperatura ótima para extração situa-se entre 80 a 95 °C, sendo que quando extraídos a 100 °C por um período prolongado, muitos de seus compostos podem ser degradados (PERVA-UZUNÁLIC *et al.*, 2005). NISHITANI e SAGESAKA (2004) obtiveram um rendimento de 30% de extrato seco quando 200 g de chá-verde foram extraídos em 3 litros de água (60 °C) por 15 min. IKEDA e colaboradores (2003) observaram que em extração a quente ou quando o chá é pasteurizado, uma considerável fração das catequinas (em torno de 50%) é epimerizada na posição-2 do anel C. Isto não é desejável quando se pretende estudar os componentes presentes na forma natural da planta.

Para a escolha de dois sistemas para extração assistida por ultra-som, verificou-se 4 sistemas de solventes, sendo: 1º.) H₂O:EtOH (75:25 V/V); 2º.) H₂O (pH = 3); 3º.) H₂O:Me₂CO (1:1 V/V); 4º.) H₂O (pH = 5). Também avaliou-se o tempo de banho com ultra-som deixando-se por 30, 60 e 90 minutos. Nestes ensaios preliminares, verificou-se que a extração apenas com água em ultra-som, tanto acidificada ou não, teve rendimentos muito inferiores às associações com EtOH ou Me₂CO. Também não houve um incremento justificável no rendimento e/ou na quantificação dos extratos submetidos a mais de 30 minutos em banho com ultra-som. Portanto, selecionou-se os sistemas com solventes binários (H₂O:EtOH e H₂O:Me₂CO) e padronizou-se o tempo em 30 minutos. A amostra utilizada para este teste foi a CVB-V1.

Foi possível verificar um rendimento maior e significativo [ANOVA (SNK) P = 0,0252] da extração assistida por ultra-som por 30 minutos no sistema 2, utilizando como solvente extrator água e acetona (1:1 V/V) (Fig. 4), em comparação com o método de extração apenas com água a 80 °C por 20 minutos (sistema 1). Isto sugere que a menor polaridade do sistema auxilia na maior extração dos componentes do chá-verde brasileiro. O sistema 3 com extração assistida por ultra-som com solvente extrator menos apolar, obteve rendimento similar ao sistema 1.

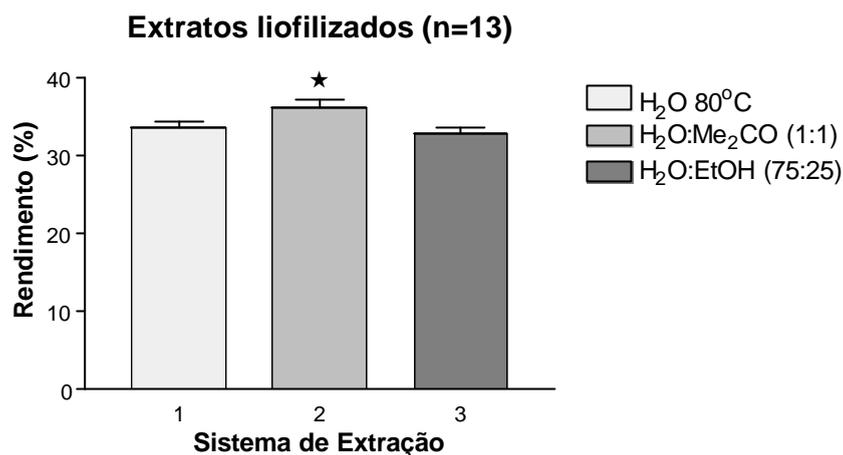


Figura 4 – Rendimento médio percentual e respectivos erros padrão da média (n=13) dos extratos liofilizados obtidos da extração do chá-verde brasileiro em três sistemas selecionados. * Comparado entre os sistemas [ANOVA (SNK) P < 0,05]

5.2 Determinação simultânea das catequinas e cafeína nas amostras de chá-verde, por CLAE-DAD

5.2.1 Desenvolvimento do método

Na cromatografia líquida de alta eficiência, a separação cromatográfica depende das interações que ocorrem entre a amostra, fase estacionária e fase móvel. As separações resultam, então, do equilíbrio dessas interações, conhecidas como interações primárias.

As fases móveis compostas por H₂O:MeOH ou H₂O:ACN são as mais mencionadas na literatura, sendo necessários a acidificação da fase aquosa e o uso de gradiente para uma melhor eficiência e, temperatura estabilizada na área de trabalho (DALLUGE e NELSON, 2000; NISHITAMI e SAGESAKA, 2004; SHARMA *et al.*, 2005). A reprodutibilidade dos métodos descritos torna-se inviável quando não se tem disponível os equipamentos com os mesmos recursos e a mesma coluna cromatográfica (formato, tamanho, porosidade, tipo e tratamento da partícula) (DALLUGE *et al.*, 1998).

É desejável que um método cromatográfico para se utilizar na rotina laboratorial, seja robusto para operar nas variações de temperatura ambiente, isocrático e utilize colunas de baixo custo.

Usou-se como ponto de partida o método proposto por SAITO e colaboradores (2006) para determinação de cafeína (CAF), catequina (C), epicatequina (EC) e galato de epigallocatequina (EGCG) usando coluna C-18 Merck Lichrosorb[®]. Porém, este método, apresentava apenas o EGCG e EC bem resolvidos. Então, optou-se em desenvolver outro método e validá-lo visto que era necessário mais eficiência para quantificação precisa da CAF e da C e de outras catequinas de interesse como epigallocatequina (EGC), galato de galocatequina (GCG) e galato de epicatequina (ECG). Nos testes preliminares usando colunas C-18 Merck Lichrosphere[®], Keystone[®] e Phenomenex Gemini[®] disponíveis e com fase móvel composta tanto por H₂O:MeOH ou H₂O:ACN nas proporções descritas na literatura, não se obteve eficiência para separar a CAF do EGC ou EC do EGCG no modo isocrático. Escolheu-se então a coluna que se mostrou ter maior fator de retenção para os compostos (Phenomenex Gemini[®]) e em seguida trabalhou-se na composição da fase móvel de modo a conseguir melhor eficiência na separação dos compostos.

Sendo a maior dificuldade a resolução entre CAF e EGC (picos 1 e 2 da Figura 5), isto só foi resolvido quando pequenas quantidades de acetato de etila foram adicionadas na fase móvel. Houve completa resolução entre os picos 1 e 2, sem afetar a resolução dos outros componentes, quando se adicionou 2,24% de acetato de etila, conforme descrito no item 4.5.1.2. Isto demonstra que a eficiência da separação foi mais dependente, entre as outras interações que possam ocorrer entre os solventes, do que simplesmente pela força de eluição devida à polaridade da fase móvel: H₂O:MeOH (85:15, V/V) – Polaridade (P') = 9,43; H₂O:MeOH (850:130, V/V) – P' = 9,53 e H₂O:MeOH: AcOEt (850:130:22,5, V/V) – P' = 9,41.

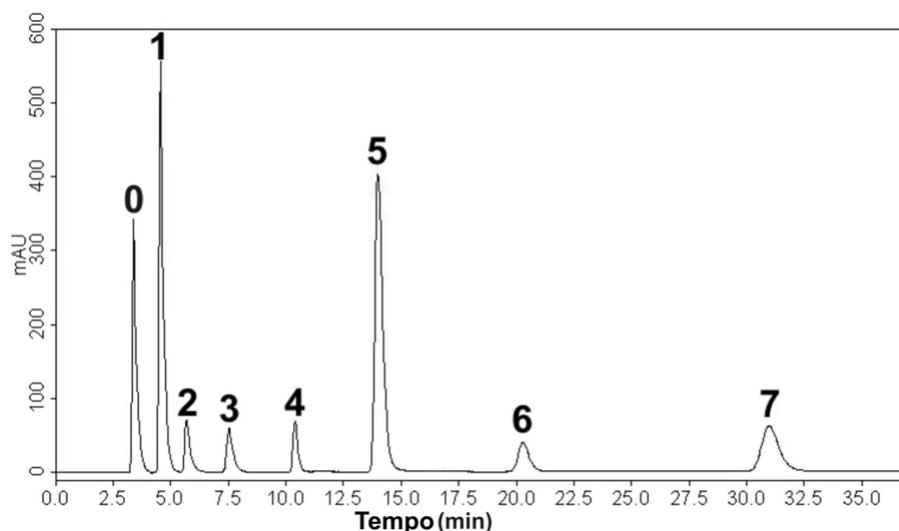


Figura 5 – Cromatograma das SQR. 0 = AG 76 µg/ml, 1 = CAF 136 µg/ml, 2 = EGC 363 µg/ml, 3 = C 75 µg/ml, 4 = EC 113 µg/ml, 5 = EGCG 571 µg/ml, 6 = GCG 76 µg/ml, 7 = ECG 150 µg/ml. Detecção em 280 nm.

5.2.2 Identificação dos compostos por CLAE-DAD

A identificação dos picos no cromatograma das amostras foi realizada a partir dos tempos de retenção das substâncias químicas de referência, da similaridade entre os espectros UV das amostras com a literatura (Tab. 13) e com o espectro da substância química de referência pelo DAD e pela adição de substância de referência na amostra.

Tabela 13 – Absorção no UV e identidade dos picos do cromatograma da Figura 5.

Pico	TR (min)	? máx observ. (nm)	Identidade	? máx na literatura (nm)*
0	3,38	271, 230	ácido gálico	273; 232; 272; 226,5; 270,5
1	4,55	272, 233	cafeína	270; 234; 226,5; 272,5
2	5,68	234, 269	epigallocatequina	235,5; 269; 271; 272
3	7,53	233, 278	catequina	233; 263; 280
4	10,39	233, 278	epicatequina	234; 277; 280
5	13,99	233, 273	galato de epigallocatequina	236; 272; 275; 279,5; 277; 226,5; 274,5
6	20,29	232, 274	galato de galocatequina	235; 273
7	30,97	277, 232	galato de epicatequina	234; 275,5; 280; 226,5; 276,5; 279

* YAO *et al.*, 2004

5.2.2.1 Espectros UV das SQR

Analisando-se os perfis dos espectros apresentados na Figura 6, podem-se observar três grupos de substâncias com perfis UV semelhantes. O primeiro desses grupos é composto pelas substâncias: ácido gálico e cafeína que apresentam tempo de retenção de 3,38 e 4,55 min., respectivamente, conforme Figura 5. O segundo grupo é composto pelas substâncias: epigalocatequina, catequina, epicatequina que apresentam tempo de retenção de 5,68; 7,53 e 10,39 min., respectivamente conforme Figura 6. O terceiro grupo é composto pelas substâncias: galato de epigalocatequina, galato de galocatequina e galato de epicatequina que apresentam tempo de retenção de 13,99; 20,29 e 30,97 min., respectivamente conforme Figura 6.

Observando a Figura 6 e a Tabela 13, pode-se inferir a impossibilidade de quantificar o ácido gálico, as catequinas ou cafeína por método simplesmente espectrofotométrico na região do UV, sem prévia separação de seus componentes, nas amostras de chá-verde por todos estes componentes possuem absorvância entre 220 e 300 nm. Para solucionar este problema é necessário a utilização de técnicas mais eficientes onde ocorre um tratamento da amostra antes que o analito passe pelo detector como é o caso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD).

5.2.2.2 Análise do tempo de retenção

A amostra ECVB-V1A foi submetida à análise por CLAE utilizando o mesmo sistema cromatográfico do cromatograma da Figura 5. Os cromatogramas das substâncias químicas de referência (SQR) e da amostra foram sobrepostos conforme Figura 7. Com base no tempo de retenção dos picos das SQR e da amostra, não foi possível identificar os componentes no cromatograma da amostra devido à não sobreposição exata dos picos de referência, assim como haver muitos picos com tempo de retenção próximo ao referência (Fig. 7). Devido a isto, fez-se necessária a utilização de outras técnicas para confirmação dos picos conforme descrito nos itens adiante.

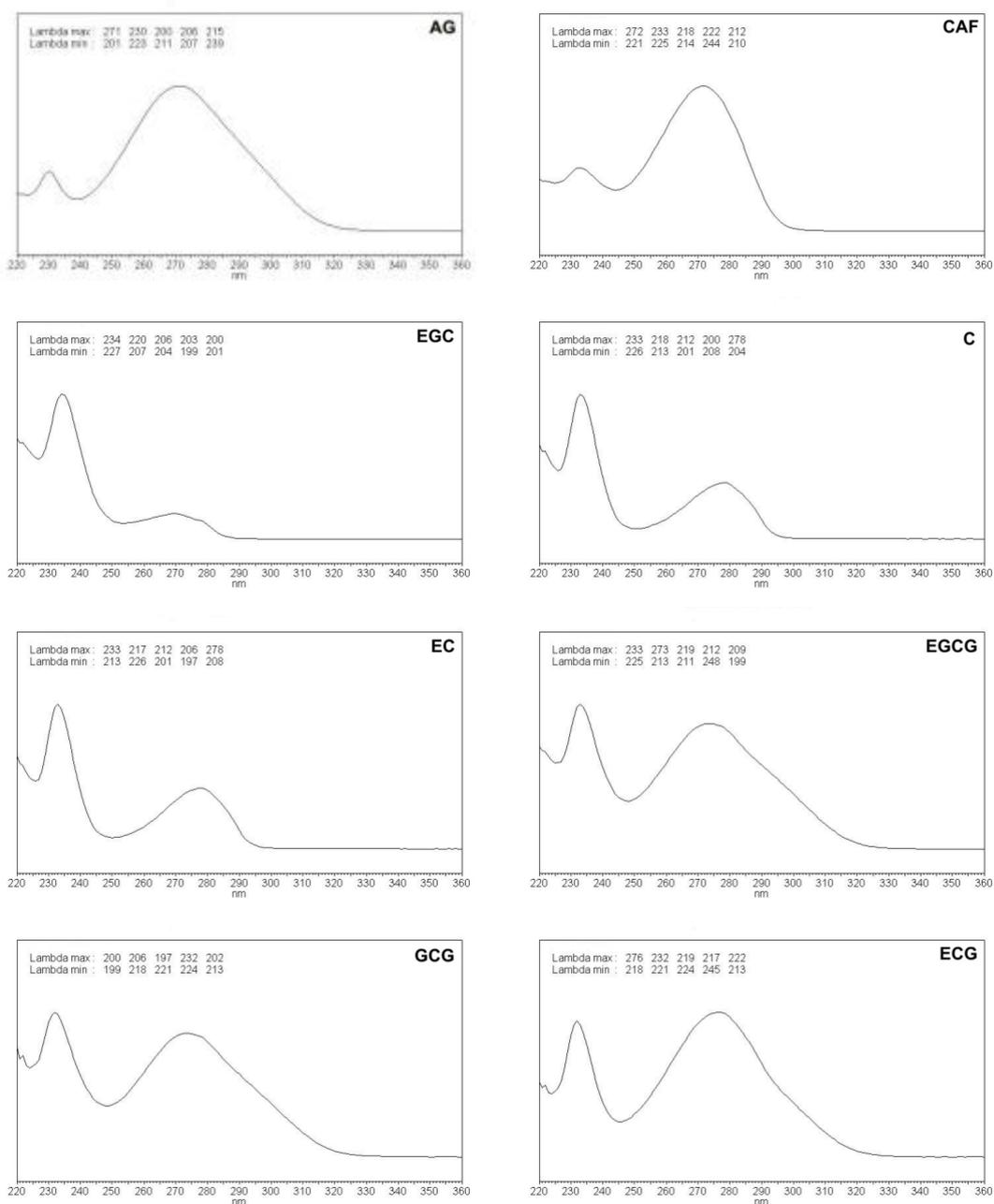


Figura 6 – Espectro UV de cada pico referente ao cromatograma da Figura 5.

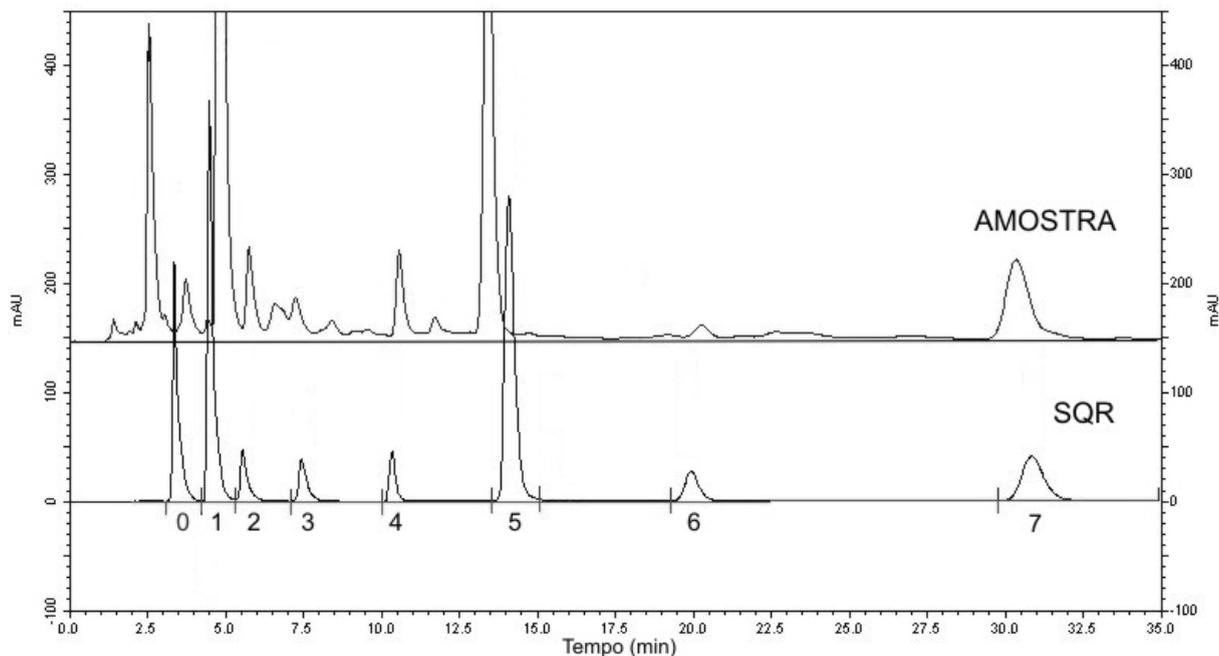


Figura 7 – Cromatograma das SQR sobreposto com amostra ECVB-V1A. Para as SQR os picos se referem a: 0 – AG, 1 – CAF, 2 – EGC, 3 – C, 4 – EC, 5 – EGCG, 6 – GCG e 7 – ECG.

5.2.2.3 Adição de substância química de referência na amostra

O método de adição de substância de referência consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada à quantidades conhecidas da amostra, antes de sua análise. O método de adição de padrão é um processo mais meticuloso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa ou quando as interações com a matriz são significativas (RIBANI *et al.*, 2004).

Após os resultados do cromatograma com a adição de substância de referência, se pode inferir a identificação dos picos: 1 – cafeína, 2 – epigallocatequina, 3 – catequina, 4 – epicatequina, 5 – galato de epigallocatequina, 6 – galato de galocatequina, 7 – galato de epicatequina. Conforme Figura 8.

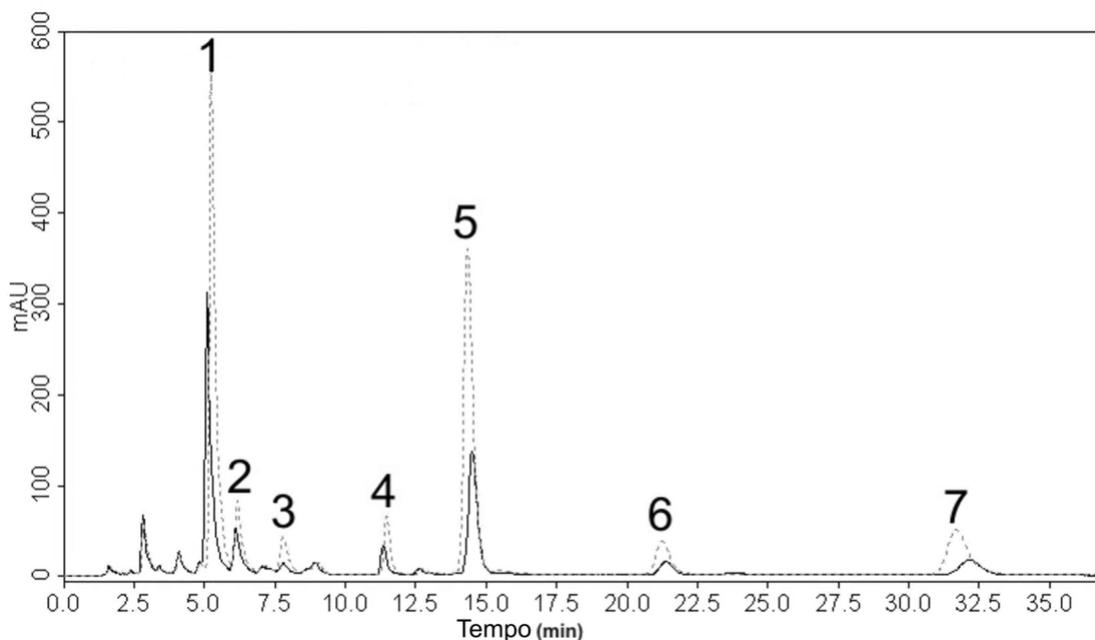


Figura 8 – Cromatograma da amostra ECVB-V1A na concentração de 2002 µg/ml (linha) sobreposto com a mesma amostra com adição das SQR (pontilhado): 1 = CAF, 2 = EGC, 3 = C, 4 = EC, 5 = EGCG, 6 = GCG e 7 = ECG. Detecção em 280 nm.

5.2.2.4 Comparação dos espectros UV e índice de similaridade

Nas regiões onde houve muitos picos próximos ao tempo de retenção (TR) da substância química de referência (SQR), fez-se necessária a comparação dos espectros UV de cada um deles avaliando-se a similaridade com o da respectiva SQR.

Na Figura 9, é comparada a similaridade do espectro da SQR de cafeína (CAF) [1] com TR = 4,55 min, com os quatro picos próximos na qual apenas o de TR = 5,39 apresentou um índice de similaridade superior a 0,99.

Para a epigalocatequina (EGC) [2] apenas foi necessário a comparação com o pico mais próximo ao da SQR, de TR = 6,11 min., na qual obteve similaridade e sobreposição dos espectros. Conforme Figura 10.

Para a catequina (C) [3], de TR = 7,80 min, apesar do índice de similaridade ter sido superior a 0,99 em relação a SQR, os espectros não foram sobreponíveis na

região acima de 220 nm, conforme Figura 11. Isto pode ser resultado de sua baixa concentração na amostra onde a matriz pode influenciar na sua absorvância.

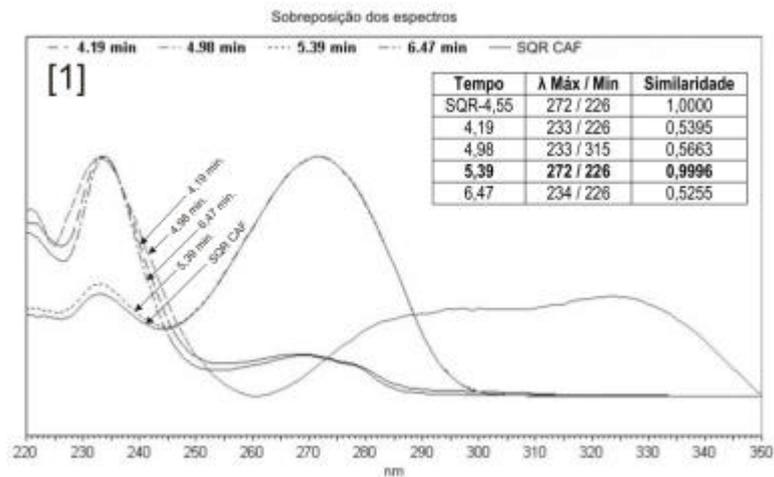


Figura 9 – Sobreposição dos espectros de SQR de cafeína com quatro espectros com TR próximos na amostra.

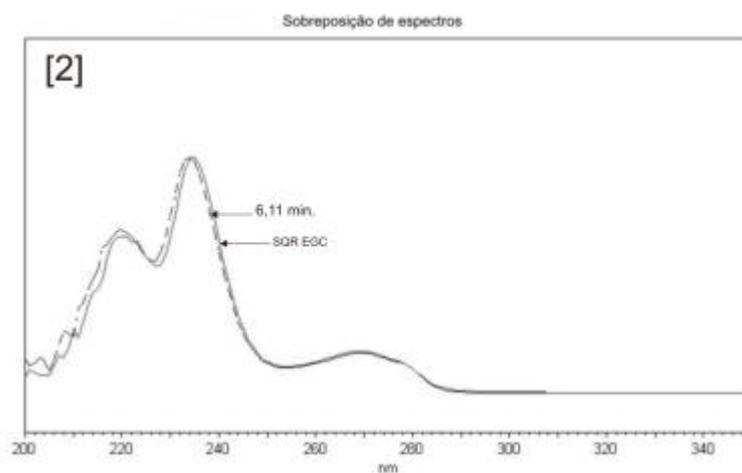


Figura 10 – Espectro da SQR de epigalocatequina (EGC) (linha) sobreposto com espectro do pico de TR = 6,11 min da amostra (pontilhado).

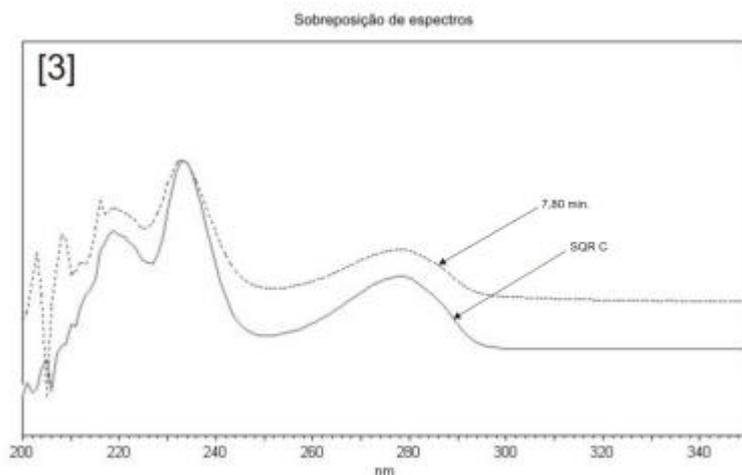


Figura 11 – Espectro da SQR de catequina (C) (linha) sobreposto com espectro do pico de TR = 7,80 min da amostra (pontilhado).

A Figura 12 apresenta novamente a sobreposição dos espectros dos picos próximos ao do tempo de retenção de SQR de epicatequina (EC), e apenas houve similaridade com o pico de TR = 11,89 min [4] confirmando com o visto na adição de substância de referência (Fig. 8).

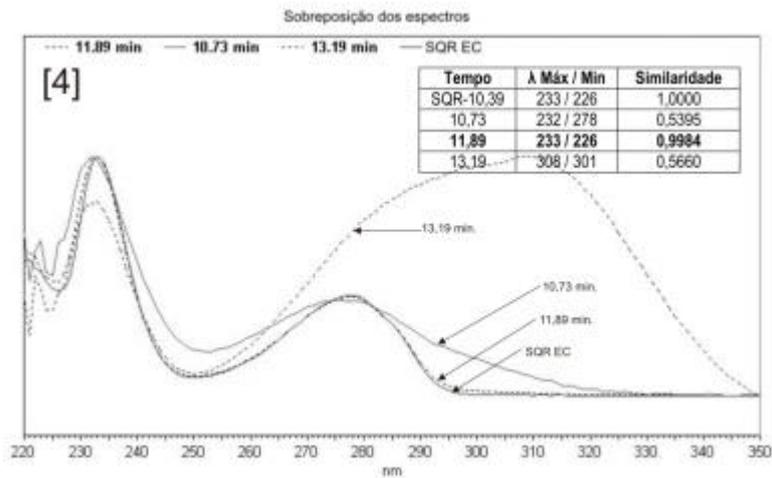


Figura 12 – Sobreposição dos espectros de SQR de epicatequina (EC) com espectros com TR próximos na amostra.

Sabendo que o galato de epigalocatequina (EGCG) é uma das catequinas majoritárias, analisou-se a similaridade do pico de tempo de retenção próximo ao da SQR e de maior área. Observou-se que os picos entre a amostra e a SQR eram sobreponíveis conforme Figura 13.

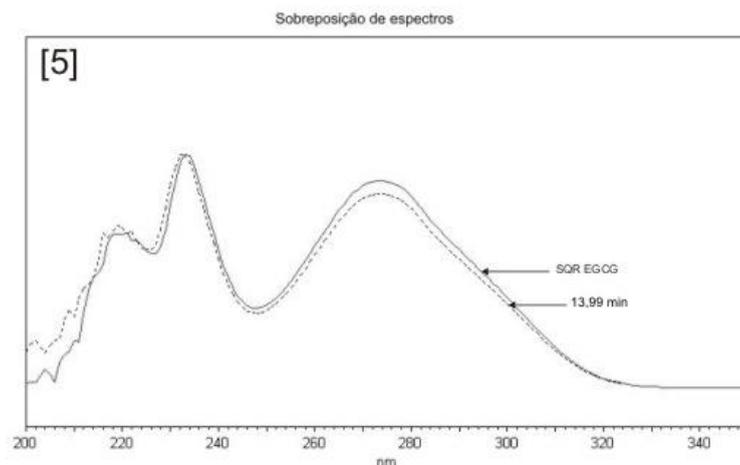


Figura 13 – Espectro da SQR de galato de epigalocatequina (EGCG) (linha) sobreposto com espectro do pico de TR = 13,99 min da amostra (pontilhado).

Da mesma forma, foi observada similaridade na sobreposição dos picos referentes ao galato de galocatequina (GCG) e ao galato de epicatequina (ECG) das SQR e amostras conforme Figuras 14 e 15.

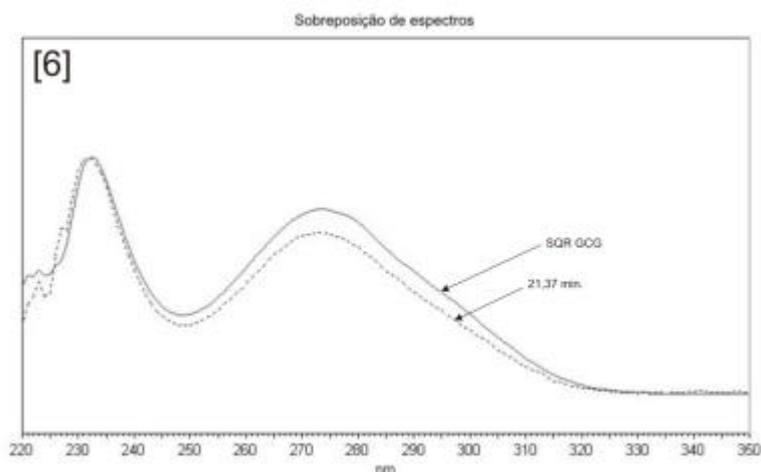


Figura 14 – Espectro da SQR de galato de galocatequina (GCG) (linha) sobreposto com espectro do pico de TR = 21,37 min da amostra (pontilhado).

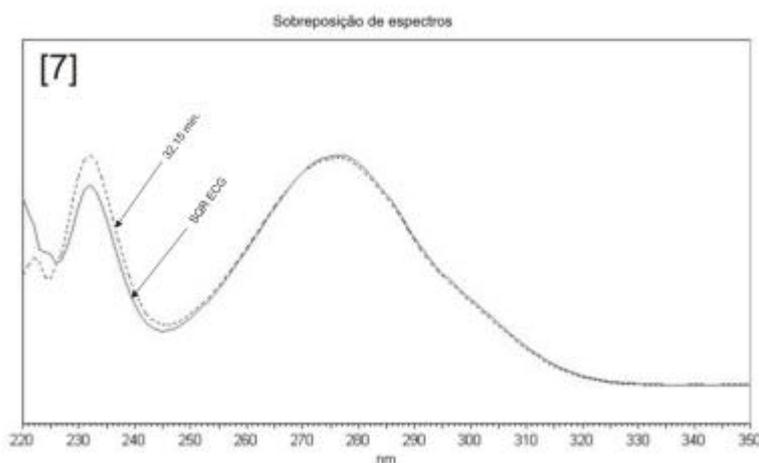


Figura 15 – Espectro da SQR de galato de epicatequina (ECG) (linha) sobreposto com espectro do pico de TR = 32,15 min da amostra (pontilhado).

Na Tabela 14 constam os índices de similaridade observados entre todos os picos analisados em relação às SQR e a diferença entre seus tempos de retenção.

Tabela 14 – Índice de similaridade do espectro do pico da SQR e amostra.

Pico	Componente	Descrição	? Máx / Min (nm)	Similaridade
[1]	CAF	SQR (TR = 4,55 min)	272 / 226	1,0000
		Amostra (TR=5,39 min)	272 / 226	0,9996
[2]	EGC	SQR (TR = 5,68 min)	234 / 227	1,0000
		Amostra (TR = 6,11 min)	234 / 221	0,9998
[3]	C	SQR (TR = 7,53 min)	233 / 226	1,0000
		Amostra (TR = 7,80 min)	233 / 217	0,9955
[4]	EC	SQR (TR = 10,39 min)	233 / 226	1,0000
		Amostra (TR = 11,89 min)	233 / 226	0,9984
[5]	EGCG	SQR (TR = 14,50 min)	233 / 220	1,0000
		Amostra (TR = 13,99 min)	232 / 221	0,9974
[6]	GCG	SQR (TR = 20,29 min)	232 / 224	1,0000
		Amostra (TR = 21,37 min)	232 / 228	0,9935
[7]	ECG	SQR (TR = 30,97 min)	276 / 226	1,0000
		Amostra (TR = 32,15 min)	232 / 246	0,9974

5.3 Validação

5.3.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Os testes realizados para adequabilidade do sistema cromatográfico visam a garantir que os componentes do sistema cromatográfico (equipamento, reagentes, coluna e analista) estão adequados à aplicação pretendida (RIBANI *et al.*, 2004).

Na Tabela 15 dispõem-se os desvios padrão relativos (DPR) obtidos na repetibilidade das injeções das SQR, para área absoluta e tempo de retenção.

O DPR referente à repetibilidade nos tempos de retenção foram < 2, se mostrando dentro dos limites desejáveis para cada pico. Para os DPR referentes às áreas absolutas, observou-se que apenas o galato de galocatequina (GCG) teve um valor > 2, e isto pode ser devido à baixa razão entre sinal/ruído podendo ter mais interferência com a linha de base.

Tabela 15 – DPR dos tempos de retenção e áreas absolutas, obtidos com a solução das SQR, durante a realização dos testes para adequabilidade do sistema cromatográfico, utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), detecção a 280 nm e fase móvel constituída de água, acidificada com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03: metanol: acetato de etila (850:130:22,5 V/V).

Pico	Componentes	Concentração µg/ml	*TEMPO DE RETENÇÃO		*AREA	
			Minutos	DPR	Absoluta	DPR
0	AG	89	3,47	0,58	4970264	1,43
3	(+)-C	102	7,53	1,45	1292876	1,77
1	CAF	186	4,55	0,47	8140049	1,47
4	(-)-EC	155	10,39	0,83	1116506	1,56
7	(-)-ECG	204	30,97	1,66	3716401	1,36
2	(-)-EGC	495	5,68	1,37	1358684	1,19
5	(-)-EGCG	779	13,99	1,32	11197068	1,66
6	(+)-GCG	104	20,29	1,82	1503041	11,00

* refere-se à média de 4 injeções

Tabela 16 – Valores médios obtidos na avaliação dos parâmetros de Rs, k', a, T e N nas soluções das SQR, obtidos durante a realização dos testes para adequabilidade do sistema cromatográfico, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), detecção a 280 nm e fase móvel constituída de água, acidificada com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03: metanol: acetato de etila (850:130:22,5 V/V).

Pico	COMPONENTE	*RESOLUÇÃO (Rs)	*FATOR DE RETENÇÃO (k')	*FATOR DE CAUDA (T)	*PRATOS TEÓRICO (N)
0	AG		1,16	2,41	2394
3	(+)-C	3,96	4,10	1,59	4226
1	CAF	5,09	2,15	1,97	3425
4	(-)-EC	7,37	6,21	1,42	12393
7	(-)-ECG	9,46	21,17	1,30	7848
2	(-)-EGC	3,22	2,94	1,84	3325
5	(-)-EGCG	6,74	8,53	1,55	7900
6	(+)-GCG	4,51	13,42	1,23	8142

*refere-se à média de 4 injeções

Na Tabela 16 encontram-se os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros do fator de retenção (k'), resolução (Rs), fator de cauda (T) e números de pratos teóricos (N) os quais fazem parte dos testes para adequabilidade do sistema cromatográfico. Os valores de Rs referem-se ao pico de interesse em relação ao pico imediatamente anterior.

O método proposto se mostrou adequado para ser validado com bom número de pratos teóricos (> 2000); com picos de boa simetria (< 2), com exceção do AG; bem resolvidos e com fatores de retenção superiores a 2, com exceção do AG.

5.3.2 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse na amostra dentro de uma determinada variação (BRASIL, 2003).

Cada curva-padrão foi construída usando cinco níveis de concentração, conforme preconizado pelas diretrizes do ICH (2005). As concentrações e áreas absolutas de cada substância química de referência (SQR) constam nas Tabelas 40 a 47 (ANEXO 1). Na Tabela 17 pode-se observar o resumo dos resultados das curvas padrão obtidas pelo método dos mínimos quadrados, para ácido gálico, catequina, cafeína, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina e galato de galocatequina. A curva padrão para cada substância representa a área média obtida em três diferentes dias.

Tabela 17 - Resultados obtidos no estudo da linearidade ($P < 0,05$) das curvas-padrão.

	AG	CAF	EGC	C	EC	EGCG	GCG	ECG
Níveis de concentração	5	5	5	5	5	5	5	5
Faixa ($\mu\text{g/ml}$)	20-100	37-185	99-500	20-100	30-150	150-800	20-105	40-205
Inclinação	56317	50908	3134	14721	8499	16586	16969	20989
Intercepto	40151	105050	9878	5830	7810	114693	13611	50309
coeficiente de correlação (r)	0,9999	0,9999	0,9999	1,0000	0,9999	1,0000	0,9999	0,9999

Avaliando os resultados da Tabela 17 pode-se inferir, pelos seus respectivos coeficientes de correlação e também, pela análise de variância (ANOVA), que apresentou regressão linear e diferença entre os grupos significativa e sem desvio de linearidade conforme Tabelas 48 a 55 (ANEXO 1), que o método proposto se mostrou linear para a faixa testada.

5.3.3 Precisão

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma amostra homogênea. Neste parâmetro, foi verificada a precisão intermediária e a repetibilidade do método, na amostra ECVB-V1A.

Tanto para o estudo de repetibilidade quanto para a precisão intermediária, os resultados (Tab. 18) se mostraram repetitivos e precisos para todos os componentes exceto para AG, pelo elevado DPR, o que pode ser consequência de seu baixo teor na amostra.

Tabela 18 – Valores experimentais obtidos na determinação da repetibilidade e da precisão intermediária do método para ECVB-V1A, por CLAE-DAD.

Componente	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Interdia	
	*Teor (%)	DPR	*Teor (%)	DPR	*Teor (%)	DPR	Teor médio (%) ± e.p.m.	**DPR
AG	0,06	10,43	0,06	11,24	0,06	4,24	0,06 ± 0,00	13,23
C	0,73	3,14	0,72	2,08	0,71	1,69	0,72 ± 0,01	4,94
CAF	4,15	1,08	4,24	0,77	4,22	0,33	4,20 ± 0,01	1,42
EC	2,95	1,45	3,01	0,32	3,05	0,66	3,00 ± 0,01	1,90
ECG	1,68	3,49	1,72	1,59	1,73	1,14	1,71 ± 0,01	2,70
EGC	13,93	1,15	13,56	1,09	13,96	0,45	13,83 ± 0,01	2,99
EGCG	8,86	1,39	9,08	0,62	8,95	1,01	8,96 ± 0,02	1,42
GCG	1,68	0,14	1,49	1,47	1,61	1,87	1,60 ± 0,02	6,65

*cada valor corresponde ao teor médio de 9 determinações distribuídas em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta). ** corresponde ao DPR das 27 determinações. e.p.m.- erro padrão da média.

5.3.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa a proximidade entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. É expressa como percentual de recuperação obtido através da análise de quantidades conhecidas do analito acrescidas à amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão foi determinada através da adição de quantidades conhecidas das SQR na amostra ECVB-V1A, de forma a obter duas concentrações diferentes de amostras acrescidas (AA). Cada AA foi analisada em dois diferentes dias, conjuntamente com a amostra não acrescida (A).

Na Tabela 19 dispõem-se os resultados experimentais obtidos para determinação da exatidão do método, para amostra ECVB-V1A, para cada substância de interesse.

A recuperação média ficou na faixa de 96,12 - 110,48% dependendo do componente, sendo que para o componente de maior interesse (EGCG), houve recuperação média de 103,24% com DPR < 5%. Para amostras mais complexas, tem sido aceita precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 19 – Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método para ECVB-V1A, por CLAE-DAD.

Componente	Amostra	Concentração acrescida ($\mu\text{g/ml}$)	*Concentração média encontrada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)	DPR
AG	AA ₁	22,0	21,69	98,58	0,25
	AA ₂	44,0	43,23	98,25	1,13
C	AA ₁	21,8	21,19	97,20	4,39
	AA ₂	43,6	41,82	95,91	1,54
CAF	AA ₁	39,6	40,92	103,33	2,23
	AA ₂	79,2	78,17	98,70	2,17
EC	AA ₁	33,0	33,05	100,16	3,82
	AA ₂	66,0	66,42	100,64	1,85
ECG	AA ₁	43,6	42,06	96,47	4,24
	AA ₂	87,2	84,95	97,42	0,24
EGC	AA ₁	105,6	113,14	107,14	0,90
	AA ₂	211,2	233,33	110,48	4,87
EGCG	AA ₁	166,2	170,61	102,65	4,95
	AA ₂	332,4	345,11	103,82	2,54
GCG	AA ₁	22,2	22,79	102,65	1,83
	AA ₂	44,4	46,17	103,98	0,59

*cada valor refere-se à média de três amostras analisadas em dois diferentes dias.

O método proposto se mostrou exato demonstrando pouca interferência da matriz na recuperação de todos os compostos analisados.

5.3.5 Especificidade

A especificidade de um método analítico dentre outras formas, pode ser avaliada através da determinação da pureza do pico cromatográfico, utilizando detector de arranjo de diodos (BRASIL, 2003), o qual mostra gráfica e numericamente, a similaridade do espectro do pico da substância de interesse.

A pureza do pico para ECVB-V1A foi determinada através da pureza total do pico por ser um indicador mais preciso para determinação de pureza em comparação com a determinação por três pontos do pico, onde há a possibilidade de não serem detectadas pequenas impurezas que possam estar presentes (WATSON, 2005). É calculada por comparação de todos os espectros de um pico cromatográfico com o espectro de referência. O espectro do ápice do pico é utilizado como espectro de referência.

Na Tabela 20 encontram-se os índices de pureza total dos picos cromatográficos de ECVB-V1A durante a validação do método e seu respectivo índice de pureza por 3 pontos do pico.

Quanto mais próximos de 1,0000 for o índice de similaridade/pureza do pico, mais similar ou mais puro é o pico cromatográfico. Entretanto, enquanto é fácil dizer que um pico com valores muito baixos (0,0000 – 0,8900) não é realmente puro, é mais difícil decidir se o pico com valor de pureza entre 0,9000 e 0,9500 está contaminado (SHIMADZU, 2001).

Os resultados encontrados demonstram que os picos do cromatograma do método proposto são específicos e com impurezas não detectáveis pelo DAD referente ao componente inferido.

Tabela 20 – Índice de pureza do pico cromatográfico para ácido gálico, catequina, cafeína, epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, galato de galocatequina, determinado em ECVB-V1A, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), leitura em comprimento de onda de 280 nm e fase móvel constituída de água, acidificada com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03: metanol: acetato de etila (850:130:22,5 V/V).

Substância	Impureza	Índice de Pureza	
		Total do Pico	3 pontos
AG	Não detectada	0,987181	0,918306
C	Não detectada	0,998148	0,996985
CAF	Não detectada	0,999929	0,995954
EC	Não detectada	0,999632	0,929861
ECG	Não detectada	0,995613	0,988233
EGC	Não detectada	0,999990	0,938925
EGCG	Não detectada	0,999976	0,988538
GCG	Não detectada	0,955557	0,888106

5.3.6 Limite de detecção

O limite de detecção representa a mais baixa concentração da substância em exame, que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

Na Tabela 21 encontra-se o limite de detecção estimado para cada substância de interesse, obtido conforme descrito no item 4.6.7.

Tabela 21 – Limite de detecção para cada substância de interesse.

Substância	Limite de detecção (µg/ml)
AG – ácido gálico	1,2
C - catequina	1,1
CAF - cafeína	3,6
EC - epicatequina	4,0
ECG - galato de epicatequina	4,7
EGC - epigalocatequina	6,8
EGCG - galato de epigalocatequina	14,3
GCG - galato de galocatequina	4,7

5.3.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação de um método analítico corresponde à menor quantidade da substância em exame, que pode ser quantificada com aceitável precisão e exatidão.

Para todos os componentes, com exceção do ácido gálico, a concentração encontrada em todas as amostras de chá-verde ficou acima do limite de quantificação.

Na Tabela 22 encontra-se o limite de quantificação estimado para cada substância de interesse, obtido conforme descrito no item 4.6.8.

Tabela 22 – Limite de quantificação para cada substância de interesse.

Substância	Limite de quantificação (µg/ml)
AG – ácido gálico	3,6
C – catequina	3,4
CAF – cafeína	10,9
EC – epicatequina	12,1
ECG - galato de epicatequina	14,3
EGC – epigalocatequina	20,7
EGCG - galato de epigalocatequina	43,2
GCG - galato de galocatequina	14,4

5.3.8 Robustez

A robustez é a capacidade do método de manter-se inalterado diante de pequenas variações controladas de alguns parâmetros. Esta qualidade é indicativo da confiança que se pode esperar do método durante seu uso cotidiano.

Devido à complexidade da matriz e por ser uma amostra com multi-componentes, optou-se por avaliar apenas as pequenas flutuações de pH que ocorrem durante a preparação entre fase móveis, assim como avaliou-se a leitura

em 275 nm para observar a sensibilidade do método frente a oscilações que podem ocorrer entre detectores.

A alteração no pH influenciou significativamente o tempo de corrida deixando o tempo de análise mais longa e mostrando uma desvantagem em trabalhar neste pH. Os outros parâmetros avaliados, como N, k' e Rs, ficaram dentro das especificações aceitáveis.

A avaliação da robustez do método é dada na Tabela 23 (pág. 65) e garante a validade do procedimento analítico sempre que utilizado, pois as pequenas alterações no pH da fase móvel e no comprimento de onda na leitura não influenciaram significativamente a determinação quantitativa dos componentes do chá-verde, com exceção da catequina pelo alto valor de DPR.

5.4 Teores de catequinas e cafeína encontrados nos chás-verde brasileiro

Avaliando-se as amostras de chá-verde brasileiro, extraídas através de decocção assistida, conforme item 4.4 e 4.5.1.3, pode-se observar heterogeneidade na composição de catequinas e cafeína (CAF) entre estações [Tab. 24 (pág.65)]. A maior variação foi observada em galato de epigalocatequina (EGCG) seguido por epigalocatequina (EGC) e CAF. O conteúdo de CAF foi menor na primavera se comparado com as amostras do verão. O EGC junto com EGCG foram as catequinas majoritárias encontradas nas amostras da primavera. As amostras do verão tiveram um conteúdo significativamente maior de EGCG e CAF quando comparados com as amostras da primavera (t-student $P < 0,05$). Por outro lado, não houve variação significativa entre as estações para as outras catequinas. O teor de ácido gálico (AG) não foi quantificado por ficar abaixo da faixa testada na linearidade.

5.5 Teores de catequinas e cafeína encontrados nos extratos liofilizados

A Tabela 25 (pág. 66) mostra os teores dos componentes analisados do chá-verde brasileiro extraído pelo sistema 1. Os decoctos de chá-verde brasileiro obtiveram teor médio de catequinas totais (CT) de 10,40% enquanto os extratos liofilizados extraídos pelo sistema 1 obtiveram teor médio de CT de 32,58%. Verificando que para o sistema 1 a extração é semelhante à por decocção assistida, pode ser inferido que o extrato liofilizado obteve teor médio de CT em torno de 313% superior, se comparado ao teor médio de CT mostrado na Tabela 24.

Avaliando-se os componentes das amostras individualmente, pode-se observar um perfil semelhante ao da Tabela 24 para cafeína (CAF), catequina (C), galato de galocatequina (GCG) e galato de epicatequina (ECG). Os extratos liofilizados do verão tiveram um conteúdo significativamente maior de CAF e GCG quando comparados com os extratos liofilizados colhidos na primavera (t-Student $P < 0,05$). Não se pode observar significância no teor médio, entre estações, de galato de epigalocatequina (EGCG) como mostrado na Tabela 25. E também não houve diferença significativa entre os teores de CT entre as estações estudadas.

A Tabela 26 (pág. 66) mostra os teores dos componentes do extrato liofilizado de chá-verde brasileiro extraídos pelo sistema 2. Comparando este sistema com o sistema 1, pode-se observar um teor médio de CT em torno de 121% superior. Porém os teores de CAF se mantiveram quase inalterados. Apenas as catequinas mais apolares, como o EGCG e ECG tiveram rendimento médio visivelmente superior se comparado ao sistema 1. Isto demonstra que a solução extratora, composta por $H_2O:Me_2CO$ (1:1 V/V), mesmo quando utilizada extração sem aquecimento, apenas em banho assistido com ultra-som, pode ser significativamente mais eficiente na extração de componentes e rendimento em massa (Fig. 4) que o método tradicional de decocção. CHEN e colaboradores (2001) e IKEDA e colaboradores (2003) observaram que a extração a quente ou quando pasteurizado o decocto de *Camellia sinensis* num processo industrial, uma considerável fração das catequinas (em torno de 50%) eram epimerizadas na posição-2 do anel C. No caso do EGCG, este poderia ser epimerizado para formar o GCG [ver Fig. 1 (pag. 11)]. Como apenas foi detectado a presença de GCG nas amostras extraídas pelo

sistema 1 (Tab. 25) e pela decocção assistida (Tab. 24), isto sugere que houve epimerização do EGCG durante o seu aquecimento.

A Tabela 27 (pág. 67) mostra os teores dos componentes do extrato liofilizado de chá-verde brasileiro extraídos pelo sistema 3. Neste sistema, a solução extratora foi composta por H₂O:EtOH (75:25 V/V). Comparando-se as médias entre estações para cada componente, pode-se observar um perfil muito semelhante ao do sistema 1 (Tab. 25) para CAF e EC. No entanto, o sistema 2 mostrou-se mais eficiente para extração de EGCG, ECG e EGC. O teor médio de CT também foi sempre superior quando comparado com o sistema 1 apesar de o rendimento em massa ter sido inferior ao sistema 1 (Fig. 4). Assim como no sistema 1 (Tab. 25) e na decocção assistida (Tab. 24), as amostras do verão tiveram um conteúdo significativamente maior de CAF quando comparadas com as amostras da primavera (t-Student P < 0,05). Por outro lado, não houve variação significativa entre as estações para as catequinas (EGC, C, EC, EGCG, ECG) e CT.

A Tabela 28 (pág. 67) mostra os teores dos componentes analisados das amostras comerciais de chá-verde, sendo três nacionais e duas importadas, extraídos pelo sistema 1. A amostra EACN1A demonstrou ter quantidades significativamente menores de todos os componentes se comparados com as demais amostras comerciais e os chá-verde brasileiro. Estes baixos teores sugerem que a torrefação, conforme informado no rótulo do produto, influenciou para a degradação de seus componentes naturais. A amostra EACN3A teve o maior teor de CT (35,70%) seguido da amostra EACN2A (29,70%), ambas nacionais, e tiveram os teores dentro da faixa encontrada entre as estações para o chá-verde brasileiro em estudo. Os teores de CT das amostras importadas tiveram os valores abaixo dos menores encontrados entre as coletas para o chá-verde brasileiro. Isto sugere que tanto a variedade cultivada como o clima/solo podem influenciar de forma significativa os teores dos seus metabólitos secundários.

Tabela 23 – Avaliação da robustez do método.

Componente	Método proposto					FM ^f (pH 2,50)					Detecção em 275nm					DPR ^g
	tR ^a	N ^b	k ^c	Rs ^d	MC ^e	tR ^a	N ^b	k ^c	Rs ^d	MC ^e	tR ^a	N ^b	k ^c	Rs ^d	MC ^e	
CAF	5,09	4504	2,09	1,12	197,47	5,22	4565	2,48	3,25	196,63	5,09	4562	2,09	1,14	196,17	0,34
EGC	6,11	3385	2,92	3,63	574,06	6,71	3908	3,47	4,03	524,75	6,11	3535	2,92	3,69	566,34	4,78
C	7,80	2220	4,38	0,73	38,19	8,95	4747	4,96	4,72	69,36	7,80	2263	4,38	0,70	38,91	36,44
EC	11,35	14050	6,32	3,28	107,15	12,46	14175	7,31	7,49	114,90	11,35	13854	6,32	3,03	104,96	4,79
EGCG	14,50	8760	9,52	4,99	566,72	17,66	9218	10,77	9,02	570,17	14,50	8730	9,52	4,85	575,99	0,82
GCG	21,37	7917	14,39	8,51	15,60	27,01	9132	17,01	9,97	19,64	21,38	7881	14,40	8,50	15,62	13,72
ECG	32,15	8005	22,77	9,46	137,37	40,93	8744	26,29	9,73	132,14	32,16	7980	22,78	3,75	135,69	1,98

^a tempo de retenção (min); ^b número de pratos teóricos; ^c fator de retenção; ^d resolução entre o pico antecedente; ^e concentração média (n = 3) em µg/ml; ^f fase móvel; ^g DPR entre as concentrações médias.

65

Tabela 24 – Composição [teor % ± DP(DPR)] dos componentes majoritários das decocções assistidas de chá-verde brasileiro.

	CAF (%)	EGC (%)	C (%)	EC (%)	EGCG (%)	GCG (%)	ECG (%)	CT ^a (%)
*CVB-V1	1,60 ±0,035(2,16)	4,75 ±0,177(3,72)	0,31 ±0,002(0,54)	0,92 ±0,041(4,50)	4,57 ±0,063(1,37)	0,14 ±0,018(12,98)	1,13 ±0,049(4,29)	11,82
*CVB-V2	2,18 ±0,040(1,87)	4,46 ±0,042(0,95)	0,42 ±0,007(1,63)	1,06 ±0,022(2,10)	3,96 ±0,151(3,81)	0,24 ±0,011(4,47)	1,24 ±0,012(0,97)	11,38
*CVB-V3	2,46 ±0,032(0,57)	2,76 ±0,006(0,21)	0,22 ±0,002(0,73)	0,59 ±0,004(0,63)	5,18 ±0,069(1,33)	0,13 ±0,008(6,22)	1,13 ±0,038(3,37)	10,01
*CVB-P1	1,21 ±0,017(1,40)	4,46 ±0,177(3,98)	0,19 ±0,009(4,48)	0,74 ±0,030(4,01)	3,54 ±0,137(3,88)	0,12 ±0,015(12,72)	0,77 ±0,026(3,38)	9,82
*CVB-P2	1,31 ±0,025(1,89)	4,44 ±0,030(0,68)	0,50 ±0,010(2,09)	1,15 ±0,015(1,35)	2,84 ±0,022(0,79)	0,08 ±0,001(1,25)	0,84 ±0,003(0,32)	9,85
*CVB-P3	1,56 ±0,001(0,09)	3,37 ±0,025(0,74)	0,28 ±0,004(1,36)	0,54 ±0,004(0,80)	4,23 ±0,005(0,11)	0,06 ±0,001(1,50)	1,02 ±0,027(2,68)	9,50
Média verão	2,080 ^b	3,990	0,316	0,856	4,570 ^b	0,170	1,166	11,070
Média Primavera	1,362	4,090	0,323	0,810	3,536	0,086	0,876	9,723
t ^c	4,367	0,368	0,134	0,620	20,420	1,981	3,191	3,062

*Os valores de cada amostra são a média obtida de duas infusões por amostra.

^a Catequinas totais

^b Diferença significativa

^c Comparado entre as estações (t-Student P < 0,05, t_{crítico uni-caudal}=4,30)

Tabela 25 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 1.

	CAF (%)	EGC (%)	C (%)	EC (%)	EGCG (%)	GCG (%)	ECG (%)	CT ^a (%)
*ECVB-V1	5,41 \pm 0,02(0,3)	11,74 \pm 0,52(4,4)	1,50 \pm 0,04(2,7)	3,30 \pm 0,06(1,8)	13,86 \pm 0,14(1,0)	0,85 \pm 0,05(5,5)	3,67 \pm 0,14(3,9)	34,92
*ECVB-V2	7,02 \pm 0,02(0,2)	7,02 \pm 0,02(0,2)	1,60 \pm 0,06(4,0)	2,95 \pm 0,01(0,2)	10,62 \pm 0,15(1,4)	0,56 \pm 0,00(0,4)	3,57 \pm 0,01(0,3)	26,46
*ECVB-V3	6,50 \pm 0,00(0,0)	7,98 \pm 0,02(0,2)	0,70 \pm 0,00(0,7)	2,29 \pm 0,02(1,0)	13,59 \pm 0,01(0,0)	0,70 \pm 0,00(0,5)	3,17 \pm 0,06(2,0)	28,43
*ECVB-P1	4,56 \pm 0,01(0,1)	19,04 \pm 0,12(0,6)	0,53 \pm 0,04(8,5)	3,53 \pm 0,01(0,2)	12,29 \pm 0,32(2,6)	0,57 \pm 0,00(0,1)	2,51 \pm 0,01(0,2)	38,47
*ECVB-P2	4,88 \pm 0,04(0,7)	15,08 \pm 0,10(0,7)	1,58 \pm 0,05(3,2)	5,13 \pm 0,00(0,1)	9,86 \pm 0,15(1,5)	0,39 \pm 0,01(1,6)	3,07 \pm 0,06(2,0)	35,11
*ECVB-P3	5,68 \pm 0,01(0,1)	9,42 \pm 0,03(0,4)	1,80 \pm 0,00(0,1)	2,84 \pm 0,02(0,8)	14,28 \pm 0,10(0,7)	0,50 \pm 0,01(1,6)	3,43 \pm 0,01(0,2)	32,27
Média verão	6,31 ^b	8,91	1,27	2,85	12,69	0,70 ^b	3,47	29,89
Média primavera	5,04	14,51	1,30	3,83	12,14	0,49	3,00	35,27
t ^c	2,191	-1,783	-0,076	-1,333	0,332	2,194	1,514	-1,713

* Os valores de cada amostra são os teores obtidos a partir de um *pool* de três extrações.

^a Catequinas totais

^b Diferença significativa

^c Comparado entre as estações (t-Student P < 0,05, t_{crítico uni-caudal}=2,132)

Tabela 26 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 2.

	CAF (%)	EGC (%)	C (%)	EC (%)	EGCG (%)	GCG (%)	ECG (%)	CT ^a (%)
*ECVB-V1	5,31 \pm 0,01(0,2)	13,21 \pm 0,23(1,7)	1,62 \pm 0,04(2,7)	3,21 \pm 0,03(1,0)	18,58 \pm 0,00(0,0)	nd	5,11 \pm 0,05(0,9)	41,73
*ECVB-V2	6,84 \pm 0,06(0,8)	7,27 \pm 0,01(0,1)	1,20 \pm 0,05(4,6)	2,81 \pm 0,02(0,7)	14,02 \pm 0,05(0,4)	nd	4,99 \pm 0,01(0,3)	30,29
*ECVB-V3	6,68 \pm 0,02(0,3)	8,91 \pm 0,20(2,3)	0,91 \pm 0,00(0,4)	2,78 \pm 0,05(1,6)	20,13 \pm 0,35(1,7)	nd	4,75 \pm 0,02(0,3)	37,48
*ECVB-P1	4,70 \pm 0,01(0,2)	17,57 \pm 0,09(0,5)	1,11 \pm 0,03(2,4)	4,08 \pm 0,07(1,6)	18,69 \pm 0,19(1,0)	nd	4,41 \pm 0,22(5,1)	45,86
*ECVB-P2	4,84 \pm 0,01(0,1)	16,75 \pm 0,03(0,2)	1,58 \pm 0,02(1,2)	4,76 \pm 0,01(0,2)	16,21 \pm 0,18(1,1)	nd	4,66 \pm 0,01(0,1)	43,95
*ECVB-P3	6,01 \pm 0,05(0,8)	9,37 \pm 0,09(0,9)	1,61 \pm 0,02(0,9)	2,86 \pm 0,03(1,0)	19,91 \pm 0,06(0,3)	nd	5,02 \pm 0,07(1,3)	39,26
Média verão	6,28	9,80	1,24	2,93	17,58		4,95	36,50
Média primavera	5,18	14,56	1,43	3,90	18,27		4,70	42,86
t ^c	1,711	-1,512	-0,725	-1,687	-0,325		1,228	-1,685

* Os valores de cada amostra são os teores obtidos a partir de um *pool* de três extrações.

^a Catequinas totais

^b Diferença significativa

^c Comparado entre as estações (t-Student P < 0,05, t_{crítico uni-caudal}=2,132)

Tabela 27 – Teores % (mg/100mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtidos pelo sistema 3.

	CAF (%)	EGC (%)	C (%)	EC (%)	EGCG (%)	GCG (%)	ECG (%)	CT ^a (%)
*ECVB-V1	5,40 \pm 0,03(0,5)	13,00 \pm 0,28(2,1)	1,38 \pm 0,01(0,6)	3,31 \pm 0,01(0,2)	16,72 \pm 0,05(0,3)	nd	4,40 \pm 0,03(0,7)	38,81
*ECVB-V2	6,85 \pm 0,08(1,2)	7,31 \pm 0,01(0,1)	1,53 \pm 0,03(1,8)	2,97 \pm 0,00(0,0)	12,03 \pm 0,04(0,3)	nd	4,22 \pm 0,06(1,4)	28,06
*ECVB-V3	6,43 \pm 0,03(0,4)	8,77 \pm 0,01(0,1)	0,32 \pm 0,01(4,0)	2,44 \pm 0,04(1,7)	16,18 \pm 0,08(0,5)	nd	3,85 \pm 0,01(0,3)	31,57
*ECVB-P1	4,61 \pm 0,02(0,4)	23,04 \pm 0,22(1,0)	0,14 \pm 0,01(8,0)	3,64 \pm 0,04(1,1)	16,38 \pm 0,36(2,2)	nd	3,63 \pm 0,04(1,1)	47,06
*ECVB-P2	4,76 \pm 0,00(0,1)	15,64 \pm 0,20(1,2)	1,47 \pm 0,01(0,7)	4,99 \pm 0,18(3,7)	12,26 \pm 0,13(1,0)	nd	3,69 \pm 0,01(0,2)	38,06
*ECVB-P3	5,69 \pm 0,16(2,8)	9,16 \pm 0,04(0,5)	1,24 \pm 0,01(1,1)	2,76 \pm 0,05(1,8)	16,45 \pm 0,06(0,4)	nd	4,07 \pm 0,00(0,0)	34,09
Média verão	6,23 ^b	9,69	1,08	2,91	14,98		4,16	32,82
Média primavera	5,02	15,95	0,95	3,80	15,03		3,80	39,74
t ^c	2,204	-1,435	0,226	-1,278	-0,026		1,693	-1,392

* Os valores de cada amostra são os teores obtidos a partir de um *pool* de três extrações.

^a Catequinas totais

^b Diferença significativa

^c Comparado entre as estações (t-Student P < 0,05, t_{crítico uni-caudal}=2,132)

Tabela 28 – Teores % (mg/100 mg) \pm DP (DPR) encontrados nos extratos liofilizados de amostras comerciais de chá-verde obtidos pelo sistema 1.

Componente	*EACN1A	*EACN2A	*EACN3A	*EACI1A	*EACI2A
C	0,20 \pm 0,01 (3,5)	0,85 \pm 0,02 (2,2)	0,77 \pm 0,06 (8,0)	0,42 \pm 0,02 (5,2)	0,32 \pm 0,01 (4,1)
CAF	4,40 \pm 0,01 (0,3)	7,34 \pm 0,03 (0,4)	5,85 \pm 0,04 (0,7)	4,12 \pm 0,01 (0,2)	4,28 \pm 0,02 (0,4)
EC	0,46 \pm 0,03 (6,9)	3,00 \pm 0,02 (0,7)	3,60 \pm 0,14 (3,7)	2,85 \pm 0,00 (0,1)	2,75 \pm 0,01 (0,2)
ECG	0,72 \pm 0,02 (2,6)	4,48 \pm 0,07 (1,6)	3,17 \pm 0,06 (2,0)	1,67 \pm 0,07 (4,4)	1,81 \pm 0,10 (5,7)
EGC	1,07 \pm 0,08 (7,8)	7,29 \pm 0,10 (1,4)	10,86 \pm 0,55 (5,1)	13,63 \pm 0,07 (0,5)	10,39 \pm 0,68 (6,5)
EGCG	2,87 \pm 0,03 (1,2)	13,13 \pm 0,03 (0,2)	15,45 \pm 0,68 (4,4)	8,76 \pm 0,10 (1,1)	9,30 \pm 0,09 (1,0)
GCG	2,03 \pm 0,00 (0,2)	0,72 \pm 0,01 (2,1)	0,55 \pm 0,02 (4,2)	1,67 \pm 0,07 (4,4)	0,44 \pm 0,02 (3,5)
**CT	7,35	29,47	35,70	27,90	25,01

* Teores obtidos a partir de um *pool* de três extrações. ** Catequinas totais

5.5.1 Análise estatística entre os sistemas

PAN e colaboradores (2003) verificando o efeito de diferentes solventes na extração de polifenóis e cafeína, concluíram que a acetona teve maior eficiência na extração de polifenóis que o metanol, água e etanol respectivamente. E para cafeína (CAF), a maior eficiência obtida foi com metanol seguida por água, etanol e acetona respectivamente. Quando a água foi adicionada à acetona na proporção 1:1 (V/V), aumentou a extração de polifenóis e se mantinha a menor eficiência na extração de CAF. Porém foi visto em nossos ensaios que solução extratora composta por Me₂CO:H₂O (1:1 V/V) não diminuiu significativamente a eficiência na extração de CAF.

Tabela 29 – Análise estatística de eficiência entre os sistemas. ANOVA (SNK) P < 0,05

	EGCG*	EGC*	ECG*	CAF*	EC*	GCG*	C*	CT*
Sist. 1	12,42±0,75 b	11,74±1,87	3,24±0,17 c	5,68±0,38	3,34±0,40	0,60±0,06	1,29±0,22	32,62±1,84
Sist. 2	17,92±0,97 a	12,18±1,77	4,82±0,11 a	5,73±0,38	3,42±0,34		1,34±0,12	39,76±2,26
Sist. 3	15,00±0,91 b	12,82±2,40	3,98±0,12 b	5,62±0,36	3,35±0,37		1,01±0,25	36,28±2,71

*Média de 6 amostras (±DPR). Os teores médios seguidos de mesma letra não se diferenciam significativamente.

Através da análise de variância (ANOVA) foi possível verificar que houve diferença significativa na eficiência da extração de alguns componentes conforme o sistema de extração empregado, conforme visto na Tabela 29 para galato de epigalocatequina (EGCG) e galato de epicatequina (ECG). Aplicando o teste SNK (*Student-Newman-Keuls*), verificou-se que o sistema 2 foi mais eficiente na extração de EGCG e ECG, assim como teve rendimento (% m/m) superior aos sistemas 1 e 3 [Fig. 4 - sistema 2: 36,29% ± 1,03; sistema 1: 33,66% ± 0,73; sistema 3: 32,98% ± 0,81 (média ± e.p.m.)]. Para os componentes catequina (C), CAF, epicatequina (EC) e catequinas totais (CT), o sistema 2 apresentou teores superiores aos demais, porém sem diferença significativa.

Pode-se inferir também que o sistema 2 teve a melhor relação na extração de catequinas galatos EGCG/CAF, ECG/CAF e (ECG + EGCG)/CAF visto que para

CAF todos os sistemas tiveram a mesma eficiência estatística de extração, conforme Tabelas 30, 31 e 32.

Tabela 30 – Relação dos teores de EGCG/CAF nos extratos liofilizados, por sistema de extração.

	P1*	P2*	P3*	V1*	V2*	V3*	Média
Sist. 1	2,69	2,02	2,51	2,56	1,51	2,09	2,23 ^b
Sist. 2	3,97	3,35	3,31	3,50	2,05	3,01	3,20 ^a
Sist. 3	3,55	2,58	2,89	3,10	1,76	2,52	2,73 ^{ab}

*Relação feita a partir das Tabelas 25, 26 e 27. As médias seguidas de mesma letra não se diferenciam significativamente (ANOVA (SNK) P < 0,05).

Tabela 31 – Relação dos teores de ECG/CAF nos extratos liofilizados, por sistema de extração.

	P1*	P2*	P3*	V1*	V2*	V3*	Média
Sist. 1	0,55	0,63	0,60	0,68	0,51	0,49	0,58 ^c
Sist. 2	0,94	0,96	0,84	0,96	0,73	0,71	0,86 ^a
Sist. 3	0,78	0,78	0,73	0,81	0,62	0,60	0,72 ^d

*Relação feita a partir das Tabelas 25, 26 e 27. As médias seguidas de mesma letra não se diferenciam significativamente (ANOVA (SNK) P < 0,05).

Tabela 32 – Relação dos teores de (ECG +EGCG)/CAF nos extratos liofilizados, por sistema de extração.

	P1*	P2*	P3*	V1*	V2*	V3*	Média
Sist. 1	3,24	2,65	3,12	3,24	2,02	2,58	2,81 ^b
Sist. 2	4,91	4,31	4,15	4,46	2,78	3,72	4,05 ^a
Sist. 3	4,34	3,35	3,61	3,91	2,37	3,12	3,45 ^{ab}

*Relação feita a partir das Tabelas 25, 26 e 27. As médias seguidas de mesma letra não se diferenciam significativamente (ANOVA (SNK) P < 0,05).

5.6 Atividade antioxidante *in vitro*

5.6.1 Método fotocolorimétrico do DPPH

Esta técnica se baseia na reação do radical estável, 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]) em solução metanólica. Na forma de radical, o DPPH[•] tem um máximo de absorvidade em 323,5 e 515 nm (Fig. 16); quando este é reduzido, seja por um antioxidante ou outro radical, a absorvidade em 515 nm se extingue (Fig. 17). Este decaimento da absorvância é monitorado pelo espectrofotômetro frente ao tratamento das diversas concentrações do extrato/SQR apresentadas nas Tabelas 8 a 12.

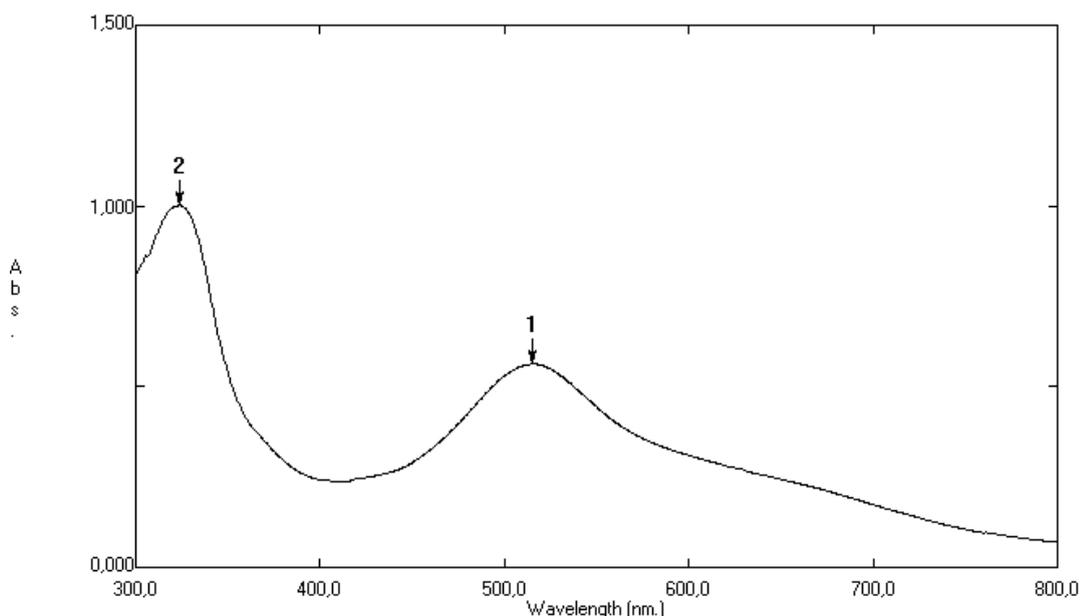


Figura 16 – Espectro do radical DPPH[•] em solução metanólica (169,9 µM) com seus máximos: 1 – 515 nm e 2 – 323,5 nm.

A concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada em 100% é dita CE₅₀, sendo os valores mais baixos que possuem maior atividade antioxidante. Para se fazer o cálculo de CE₅₀ fez-se necessária a construção das curvas-padrão de todas as amostras analisadas, inclusive do próprio radical DPPH conforme as Tabelas 33, 34, 35, 36 e 37. Todo o experimento foi feito em triplicata e os valores experimentais obtidos na quantificação do DPPH[•] remanescente nas amostras tratadas se encontram na Tabela 56 (Anexo 1). Em todas as curvas, o coeficiente de correlação (r) foi > 0,97 se mostrando linear na faixa testada.

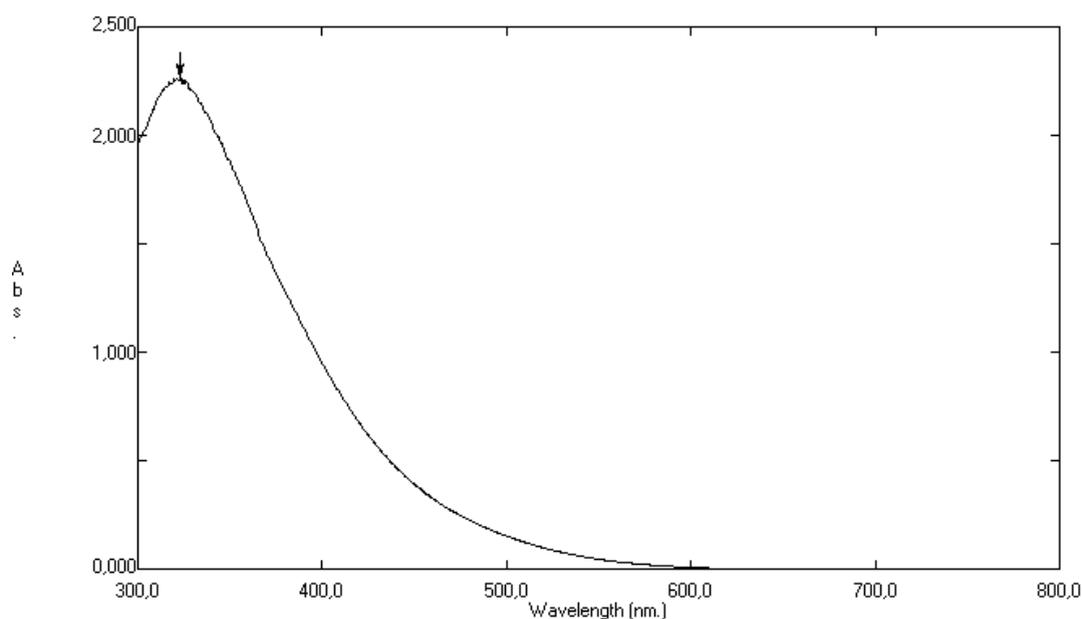


Figura 17 – Espectro do DPPH em solução metanólica (169,9 µM) reduzido por EGCG (8,32 µg/ml) com seu máximo de absorção em 323 nm.

Tabela 33 – Dados das curvas-padrão do DPPH e das SQR.

	DPPH	AA	AG	C	EC	ECG	EGC	EGCG	GCG
Número de níveis de concentração	4	5	5	5	5	5	5	4	4
Faixa	85-255 [#]	2-12 [*]	1-4 [*]	2-10 [*]	1-10 [*]	2-11 [*]	2-10 [*]	1-6 [*]	2-9 [*]
Inclinação	0,0071	-8,2065	-26,964	-6,713	-6,4603	-8,3386	-6,8906	-13,164	-10,632
Intercepto	-0,008	103,67	127,42	104,77	88,389	97,275	100	105,15	105,27
coeficiente de correlação (r)	0,9999	0,9983	0,9887	0,9891	0,9973	0,9985	0,9967	0,9989	0,9981

[#] expresso em µM ^{*} expresso em µg/ml

Tabela 34 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtido pelo sistema 1.

	ECVB-V1A	ECVB-V2A	ECVB-V3A	ECVB-P1A	ECVB-P2A	ECVB-P3A
Número de níveis de concentração	5	4	5	4	5	5
Faixa (µg/ml)	7-20	6-19	7-20	6-19	5-15	7-20
Inclinação	-4,2236	-3,6397	-3,8758	-2,5027	-3,6576	-4,282
Intercepto	107,63	105,69	109,01	87,82	107,9	108,91
coeficiente de correlação (r)	0,9918	0,9987	0,9990	0,9921	0,9972	0,9898

Tabela 35 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtido pelo sistema 2.

	ECVB-V1B	ECVB-V2B	ECVB-V3B	ECVB-P1B	ECVB-P2B	ECVB-P3B
Número de níveis de concentração	4	5	4	5	5	5
Faixa (µg/ml)	2-15	4-13	2-15	4-13	5-14	5-14
Inclinação	-4,7567	-4,063	-5,0852	-5,4775	-4,1514	-4,1662
Intercepto	89,634	92,038	92,777	100,26	103,52	96,513
coeficiente de correlação (r)	0,9991	0,9761	0,9910	0,9964	0,9906	0,9873

Tabela 36 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de chá-verde brasileiro obtido pelo sistema 3.

	ECVB-V1C	ECVB-V2C	ECVB-V3C	ECVB-P1C	ECVB-P2C	ECVB-P3C
Número de níveis de concentração	4	5	4	4	4	5
Faixa (µg/ml)	8-16	5-16	8-16	8-16	8-16	5-16
Inclinação	-5,7558	-4,3446	-4,8808	-4,365	-5,4819	-4,4534
Intercepto	135,39	114,27	128,57	115,53	135,1	114,29
coeficiente de correlação (r)	0,9984	0,9964	0,9910	0,9900	0,9906	0,9964

Tabela 37 – Dados das curvas-padrão dos extratos liofilizados de amostras comerciais de chá-verde obtido pelo sistema 1.

	EACN1A	EACN3A	EACI4A	EACI5A
Número de níveis de concentração	5	4	5	5
Faixa (µg/ml)	8-25	8-20	8-25	8-24
Inclinação	-2,8953	-4,5144	-2,7406	-2,949
Intercepto	107,12	103,88	99,344	105,86
coeficiente de correlação (r)	0,9968	0,9764	0,9926	0,9873

A concentração efetiva (CE_{50}) foi calculada por regressão linear das curvas-padrão construídas. A CE_{50} para o ácido ascórbico foi de 6,54 µg/ml para reduzir uma solução contendo 169,9 µM de DPPH'. Comparando este resultado com o obtido por CHAN e colaboradores (2007) onde a CE_{50} foi de 3,87 µg/ml de ácido ascórbico para reduzir uma solução contendo 100 µM de DPPH', extrapolando este CE_{50} para uma solução de 169,9 µM, obteríamos um valor teórico de 6,57 µg/ml, valor semelhante ao experimento aqui realizado. Entre as SQR, o ácido gálico foi o que obteve maior atividade antioxidante, bem superior ao ácido ascórbico, seguido

por galato de epigalocatequina (EGCG), galato de galocatequina, e galato de epicatequina (ECG). Este resultado está em conformidade com os resultados obtidos por BRAND-WILLIAMS e colaboradores (1995). Isto sugere a importância da esterificação da catequina com o grupamento galoil, visto que o EGC e a epicatequina apresentaram atividade antioxidante inferior ao EGCG e ao ECG, respectivamente (Tab. 38). Mesmo sendo, o galato de galocatequina um epímero do galato de epigalocatequina, não se mostrou equivalente em sua atividade antioxidante. Da mesma forma foi observada diferença na atividade antioxidante entre a epicatequina e seu epímero catequina. Isto sugere que o potencial antioxidante com DPPH[•] depende da conformação estrutural do antioxidante. As SQR que tiveram menor atividade antioxidante foram a catequina seguido da epigalocatequina.

A Tabela 38 apresenta a CE₅₀ de todos os compostos e amostras analisados assim como a quantidade equivalente em ácido ascórbico (QEAA) calculada conforme item 4.6.1.

Para os extratos liofilizados, as amostras do verão extraídos pelo sistema 2 (ECVB-V1B e ECVB-V3B) obtiveram maior atividade antioxidante. Observou-se que aproximadamente 1,28 g destes extratos possuem a atividade antioxidante equivalente a 1 g de ácido ascórbico. A menor atividade antioxidante foi observada na amostra comercial nacional EACN1A, isto pode estar relacionado ao baixo teor de catequinas. As amostras importadas EACI4A e EACI5A apresentaram menos que a metade da maior atividade antioxidante observada nos chás-verdes brasileiros mesmo diferindo em aproximadamente 12% a menos no teor de catequinas totais (CT). As amostras ECVB-P1 e ECVB-P2 apesar de possuírem maior teor de CT, 45,86% e 43,95% respectivamente, não apresentaram atividade antioxidante superior às amostras ECVB-V1 e ECVB-V3 com teor de CT de 41,73% e 37,48% respectivamente. Isto sugere que a atividade antioxidante possa ser correlacionada com o teor da catequina com maior atividade antioxidante (EGCG), conforme Tabela 25, e não pela quantidade de CT. Isto levou a analisar o índice de correlação (r) para cada componente com sua atividade antioxidante conforme item 5.6.1.

Tabela 38 – CE₅₀ das substâncias analisadas e seus respectivos valores equivalentes a 1g de ácido ascórbico.

AMOSTRAS	CE₅₀ (µg/ml)	QEAA_(g)
SQR – L(+)-ácido ascórbico	6,54	1,0000
SQR – ácido gálico	2,87	0,4388
SQR – catequina (C)	8,16	1,2477
SQR – epicatequina (EC)	5,94	0,9082
SQR – epigalocatequina (EGC)	7,26	1,1101
SQR – galato de epicatequina (ECG)	5,67	0,8670
SQR – galato de epigalocatequina (EGCG)	4,19	0,6407
SQR – galato de galocatequina (GCG)	5,20	0,7951
ECVB-V1A	13,64	2,0856
ECVB-V2A	15,30	2,3394
ECVB-V3A	15,23	2,3287
ECVB-P1A	15,11	2,3104
ECVB-P2A	15,83	2,4205
ECVB-P3A	13,76	2,1040
ECVB-V1B	8,33	1,2737
ECVB-V2B	10,35	1,5826
ECVB-V3B	8,41	1,2859
ECVB-P1B	9,18	1,4037
ECVB-P2B	12,89	1,9709
ECVB-P3B	11,16	1,7064
ECVB-V1C	14,84	2,2691
ECVB-V2C	14,79	2,2615
ECVB-V3C	16,10	2,4618
ECVB-P1C	15,01	2,2951
ECVB-P2C	15,62	2,3884
ECVB-P3C	14,44	2,2079
EACN1A	19,73	3,0168
EACN3A	11,94	1,8257
EACI1A	18,00	2,7523
EACI2A	18,94	2,8960

5.6.1.1 Correlação das amostras de chá-verde brasileiro com a atividade antioxidante

Com base na quantificação realizada em cada extrato, verificou-se a possibilidade de haver uma correlação do teor de cada substância com a atividade antioxidante, independentemente do sistema de extração. Para tanto, a regressão linear foi realizada entre o teor de cada componente individualmente, em todas as amostras de chá-verde brasileiro ($n = 18$) e sua respectiva atividade antioxidante, demonstrada pelo método fotolorimétrico do DPPH^{*}. Os valores da regressão linear entre o teor de cada substância com a CE_{50} em relação ao DPPH^{*} são apresentados na Tabela 39 com os respectivos valores de significância pelo teste-t.

Tabela 39 – Valores de correlação (r) entre CE_{50} (DPPH^{*}) versus teor de cada componente do chá-verde ($n = 18$) e teste de significância do coeficiente de correlação

	CE_{50} (DPPH)	t calculado
CE_{50} (DPPH)	1	
catequina (C)	-0,461031403	2,08
catequinas totais (CT)	-0,628436337	3,23*
epicatequina (EC)	-0,268363823	1,11
epigalocatequina (EGC)	-0,155065167	0,63
galato de epicatequina (ECG)	-0,824081491	5,82*
galato de epigalocatequina (EGCG)	-0,818776633	5,71*

$t_{.05(16)} = 2,12$ *Correlação significativa. Existe associação positiva entre o teor e a atividade antioxidante.

As melhores correlações em relação à atividade antioxidante foram obtidas para galato de epicatequina (ECG), galato de epigalocatequina (EGCG) e catequinas totais (CT) conforme Figuras 18, 19 e 20. Isto sugere que os teores de EGCG e ECG possam ser marcadores melhores para uma ótima atividade antioxidante na seleção da matéria-prima vegetal, do que o teor de CT.

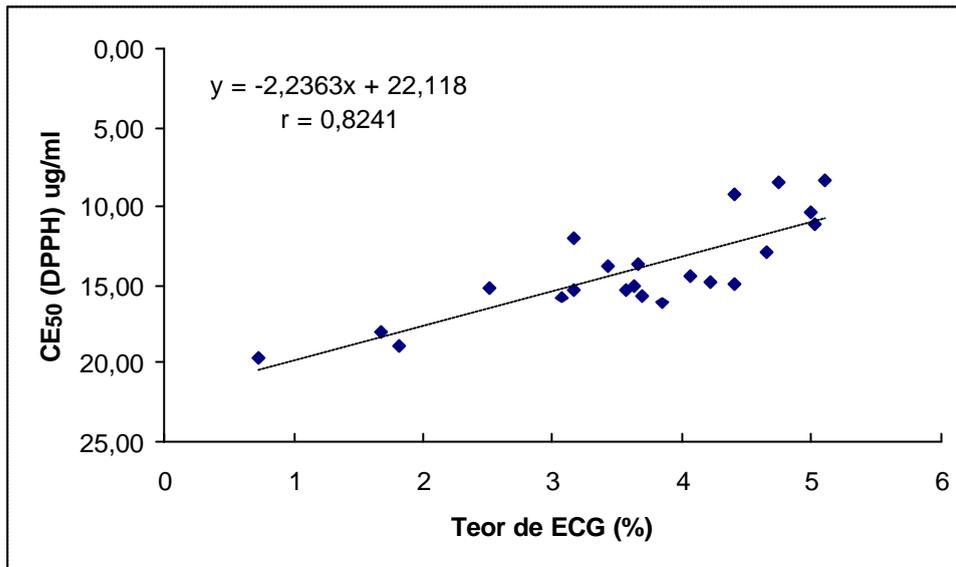


Figura 18 – Correlação (r) entre galato de epicatequina (ECG) e atividade antioxidante (n = 18).

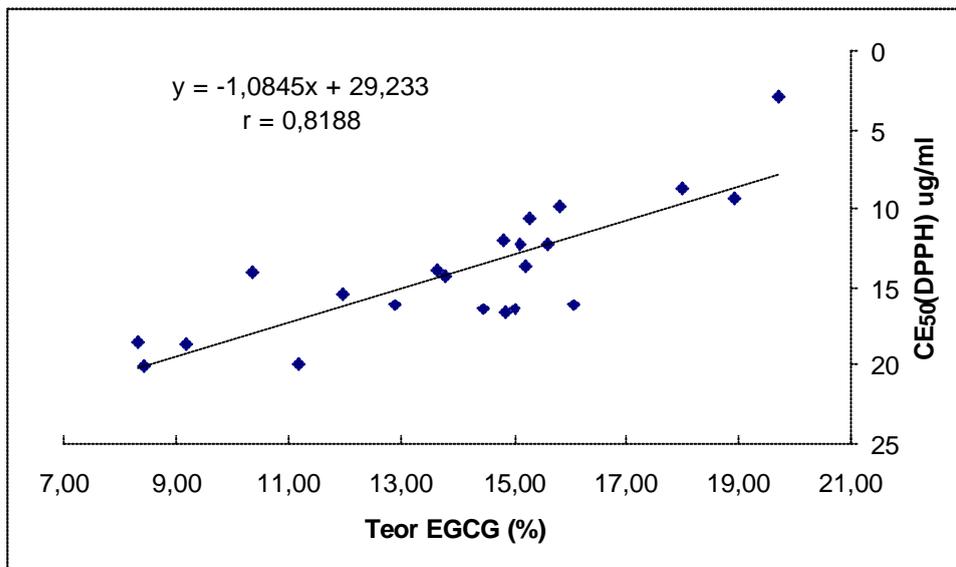


Figura 19 – Correlação (r) entre galato de epigalocatequina (EGCG) e atividade antioxidante (n = 18).

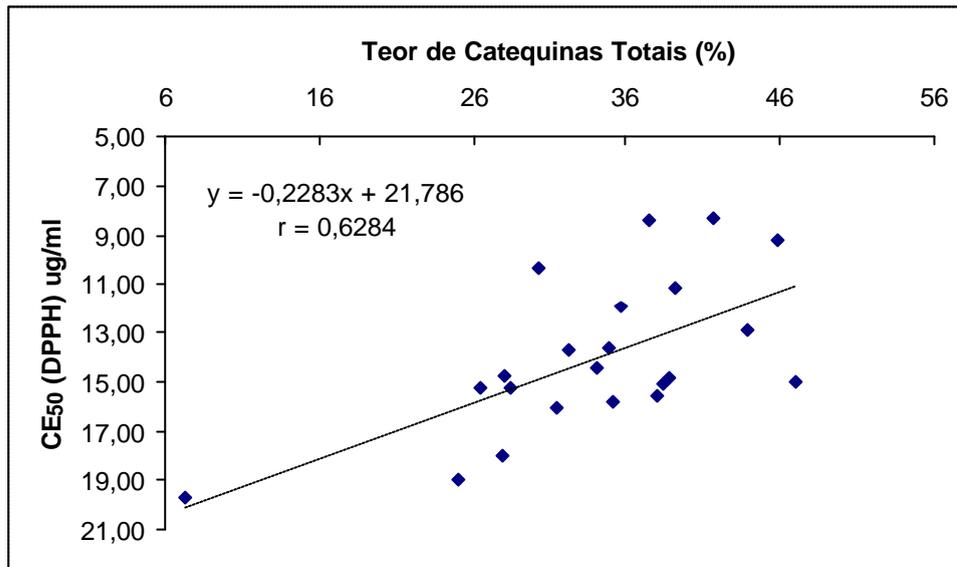


Figura 20 – Correlação (r) entre catequinas totais (CT) e atividade antioxidante (n = 18).

Mesmo sendo a epigalocatequina (EGC) o componente majoritário em algumas amostras, não se pode estabelecer uma correlação com a atividade antioxidante (Fig. 21). Neste gráfico podem ser observadas amostras com teores de EGC superiores a 15% com CE₅₀ inferior a amostras com teores entre 5 e 15%.

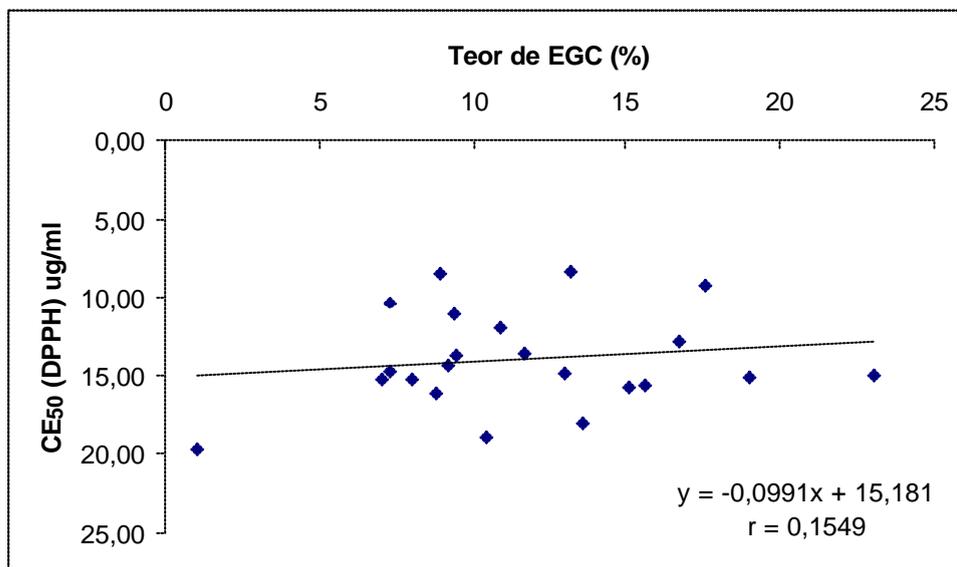


Figura 21 – Correlação (r) entre epigalocatequina (EGC) e atividade antioxidante (n = 18).

Para a EC e C não houve também nenhuma correlação expressiva entre seus teores nas amostras e a atividade antioxidante (Fig. 22 e 23).

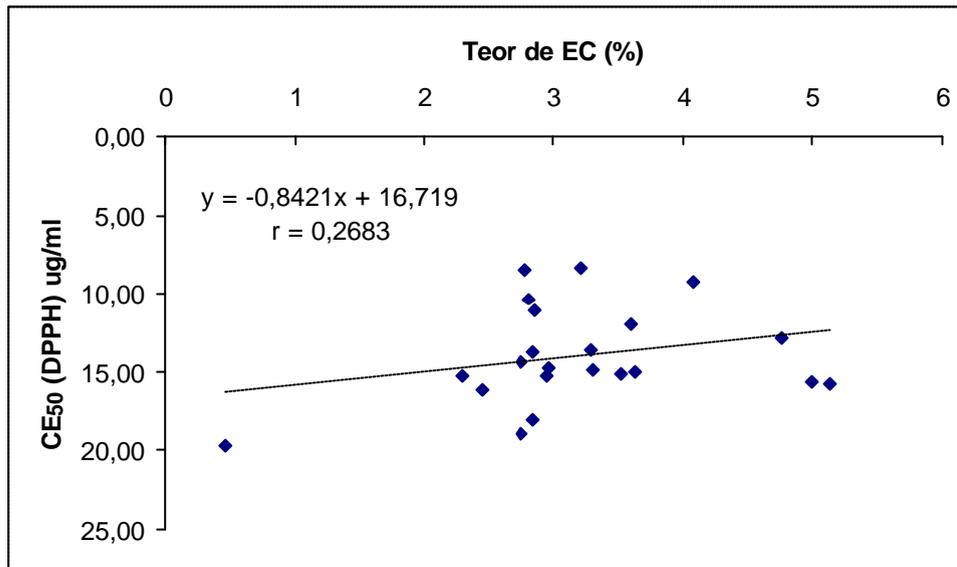


Figura 22 – Correlação (r) entre epicatequina (EC) e atividade antioxidante (n = 18).

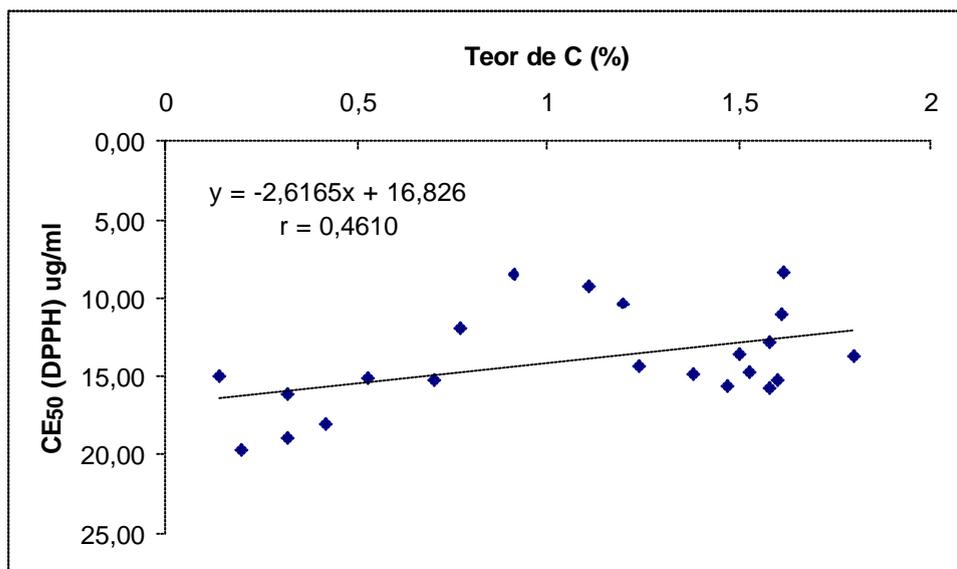


Figura 23 – Correlação (r) entre catequina (C) e atividade antioxidante (n = 18).

5.6.2 Método enzimático do sistema xantina oxidase/hipoxantina

O método desenvolvido por OWEN e colaboradores (2000) o qual também é chamado de “sistema de ensaio por padrões” (*Standard assay system*) utiliza CLAE para quantificação de radicais hidroxila pela determinação de ácidos diidroxibenzóicos, utilizando o sistema enzimático hipoxantina/xantina oxidase. Este sistema é conhecido por produzir o íon superóxido e peróxido de hidrogênio durante a hidroxilação da hipoxantina. Quando o ferro quelado é incluído neste sistema, o

superóxido reduz o ferro III para ferro II e o ferro II-quelado também reage com o peróxido de hidrogênio para formar o radical hidroxila (OH^\bullet) altamente reativo. Na técnica por CLAE, se utiliza o ácido salicílico como composto aromático apropriado para a quantificação dos radicais hidroxila. Neste sistema, os principais produtos resultantes da reação radicalar são o ácido 2,5-diidroxibenzóico e o ácido 2,3-diidroxibenzóico (DHBA) na proporção de 5:1. Estes compostos tem absorção em 325 nm, o que diminui a interferência das catequinas cujos seus máximos estão na faixa de 230 a 280 nm. Quanto menor a quantidade de DHBA em relação à amostra não tratada, que foi denominada controle positivo, mais se pode inferir uma atividade antioxidante. Neste ensaio é importante o monitoramento da quantidade de ácido úrico, cuja detecção pode ser feita em 280 nm, para avaliar a atividade da enzima xantina oxidase. Falsos negativos, quando se produz pouco DHBA devido à inativação da enzima, podem ser obtidos quando a substância a ser avaliada possa ter a capacidade desnaturante ou quando não se adiciona enzima na amostra; portanto é necessário o monitoramento do ácido úrico no final da reação.

O método por CLAE descrito por OWEN e colaboradores (2000) para separação e quantificação dos DHBA foi reprodutível para o controle positivo (Fig. 24 e 25) utilizando gradiente e fase móvel composta por $\text{Me}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ e coluna de fase reversa C-18.

Porém nas amostras tratadas com o extrato liofilizado de chá-verde, não houve especificidade e resolução entre os picos (Fig. 26) porque os compostos da reação possuem tempo de retenção semelhantes aos componentes do chá-verde.

Verificou-se para as amostras tratadas que se obtinha o pico do 2,3-DHBA ($\text{TR} = 13,59$) bem resolvido e puro pelo DAD. Para o 2,5-DHBA ($\text{TR} = 12,26$ min) detectou-se impureza em 12,60 min o que pode interferir na quantificação de sua área. Isto pode ser visualizado em 280 nm conforme Figura 29. Portanto, optou-se em apenas quantificar o 2,3-DHBA das amostras em 325 nm.

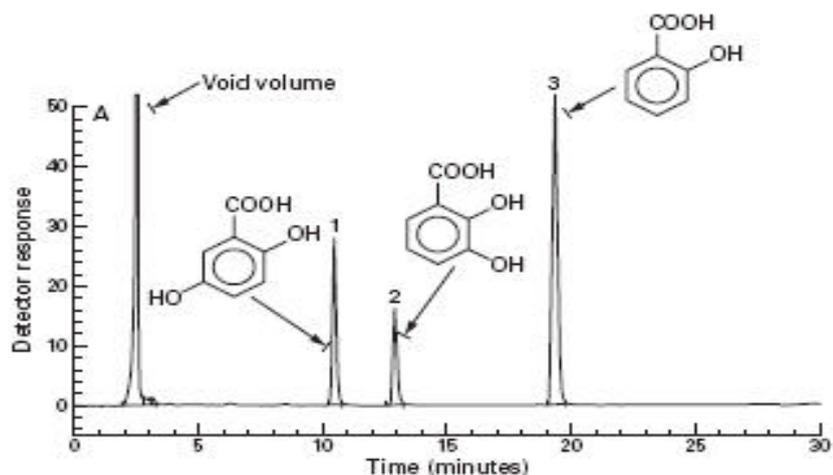


Figura 24 – Cromatograma do controle positivo: (1) 2,5-DHBA, (2) 2,3-DHBA, (3) ácido salicílico, obtido por CLAE em 325 nm, utilizando coluna C-18 (250 x 4,0 mm DI, 5 µm, Latex[®]) e fases móveis: (A) H₂O: ácido acético glacial (98:2 V/V) e (B) metanol; com seguinte gradiente: 95% de A por 2 min., 75% de A em 8 min., 60% de A em 10 min., 50% de A em 10 min. e 0% de A até completar 45 min. (OWEN *et al.*, 2000).

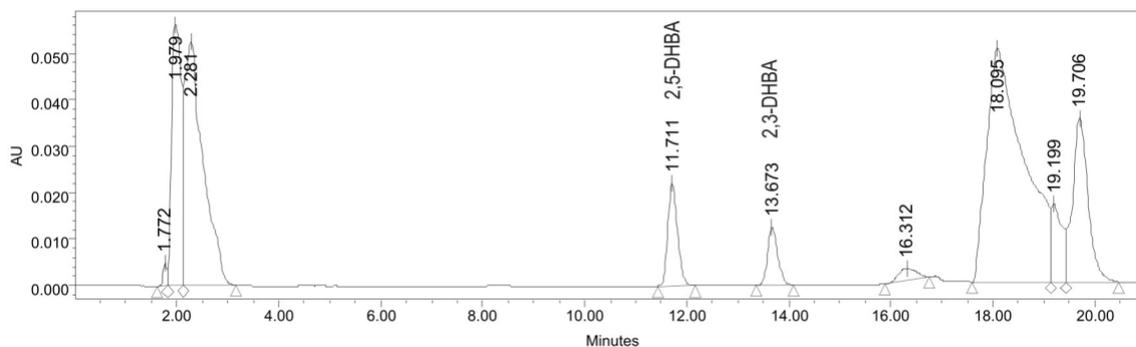


Figura 25 – Cromatograma do controle positivo obtido pelo método proposto por OWEN e colaboradores (2000), a 325 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini[®]): TR = 11,71 min: 2,5-DHBA, TR = 13,67 min: 2,3-DHBA.

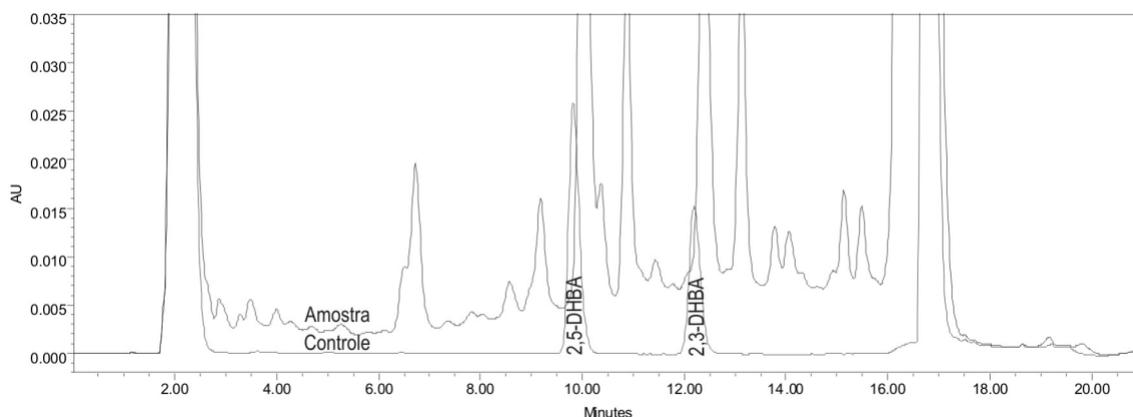


Figura 26 – Cromatograma da amostra tratada com chá-verde sobreposto com o controle positivo.

Ao testar o modo isocrático desenvolvido e validado neste trabalho, foi possível verificar que o método é adequado para a quantificação dos DHBAs e do ácido salicílico (Fig. 27 e 28) no controle positivo.

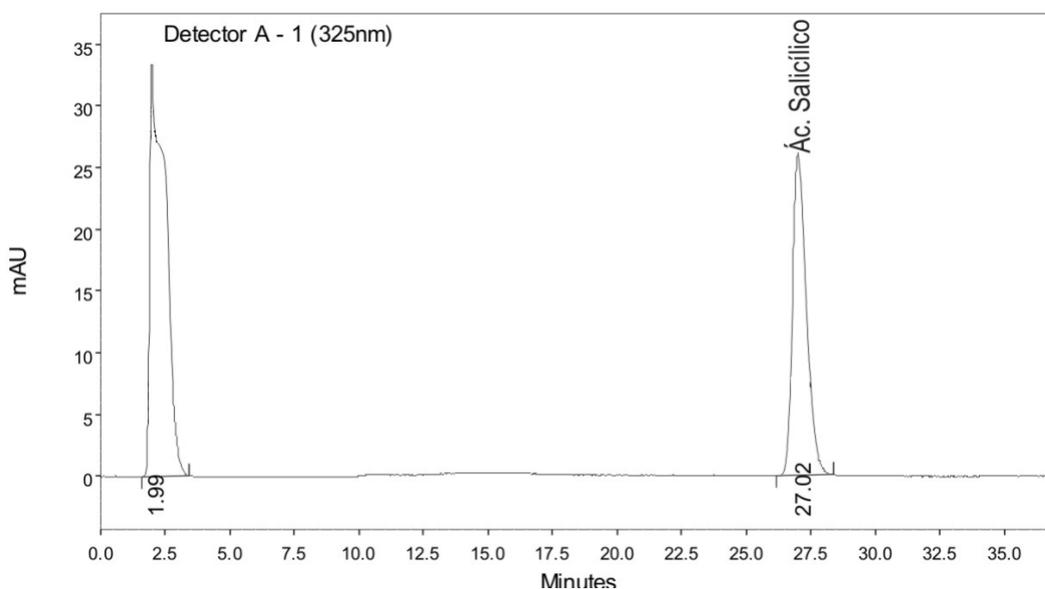


Figura 27 – Cromatograma do branco (amostra não tratada e sem enzima), no comprimento de onda de 325 nm.

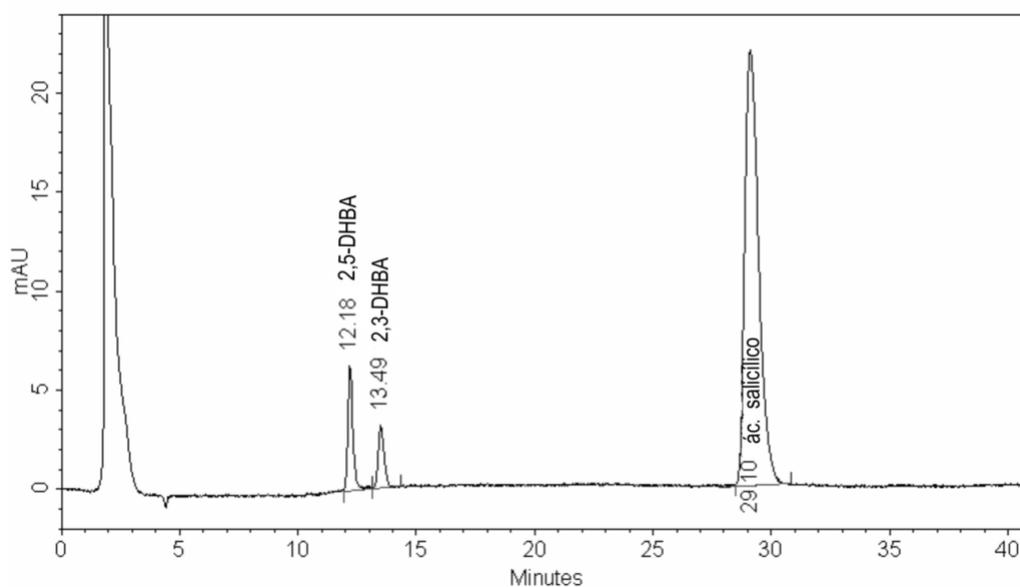


Figura 28 – Cromatograma do controle positivo pelo método isocrático. TR = 12,18 min: 2,5-DHBA; TR = 13,49 min: 2,3-DHBA; TR = 29,10 min: ácido salicílico, a 325 nm.

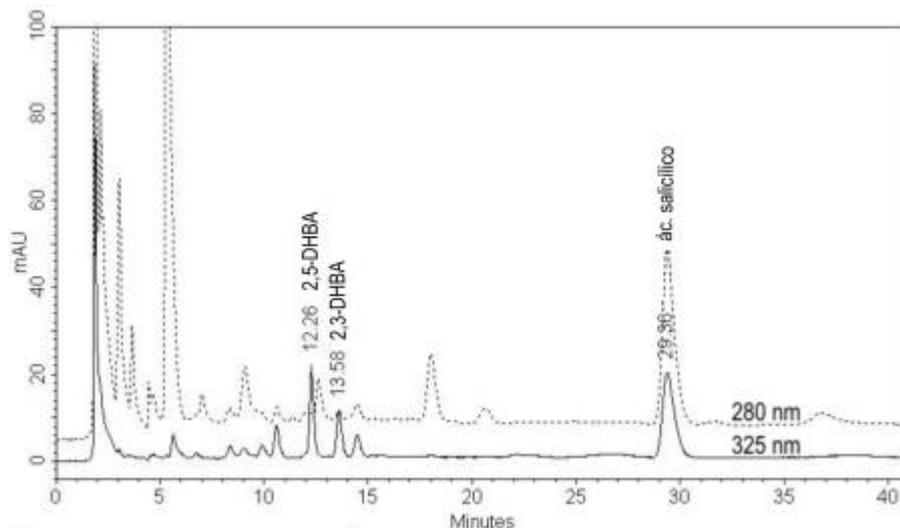


Figura 29 – Cromatograma da amostra tratada com chá-verde em 325 nm sobreposto com a mesma amostra em 280 nm.

Nos testes preliminares, observou-se que as amostras tratadas com EGCG, AG e ECVB-V3B produziam mais DHBA que o controle positivo, mesmo sem a adição de enzima na reação. O DHBA foi quantificado tanto pelo método de CLAE, segundo OWEN, para as SQR (Fig. 30 A e B) bem como para o extrato (Fig. 31), pelo método isocrático. Os resultados sugerem efeito pró-oxidante nas condições destes ensaios.

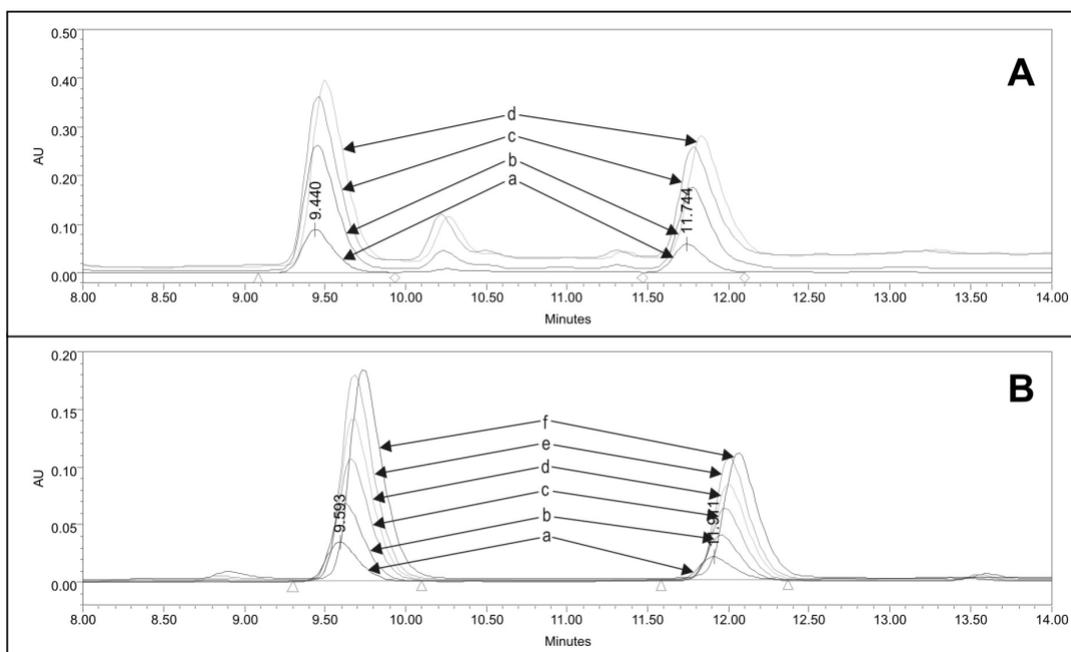


Figura 30 – A: Sobreposição dos cromatogramas das amostras tratadas com EGCG – (a) 0,25 mM; (b) 1,00 mM; (c) 3,00 mM com enzima e (d) 3,00 mM sem enzima. B: sobreposição dos cromatogramas das amostras tratadas com AG – (a) 0,25 mM; (b) 0,50 mM; (c) 1,00 mM; (d) 1,50 mM; (e) 2,00 mM e (f) 3,00 mM. Leitura feita em 325 nm.

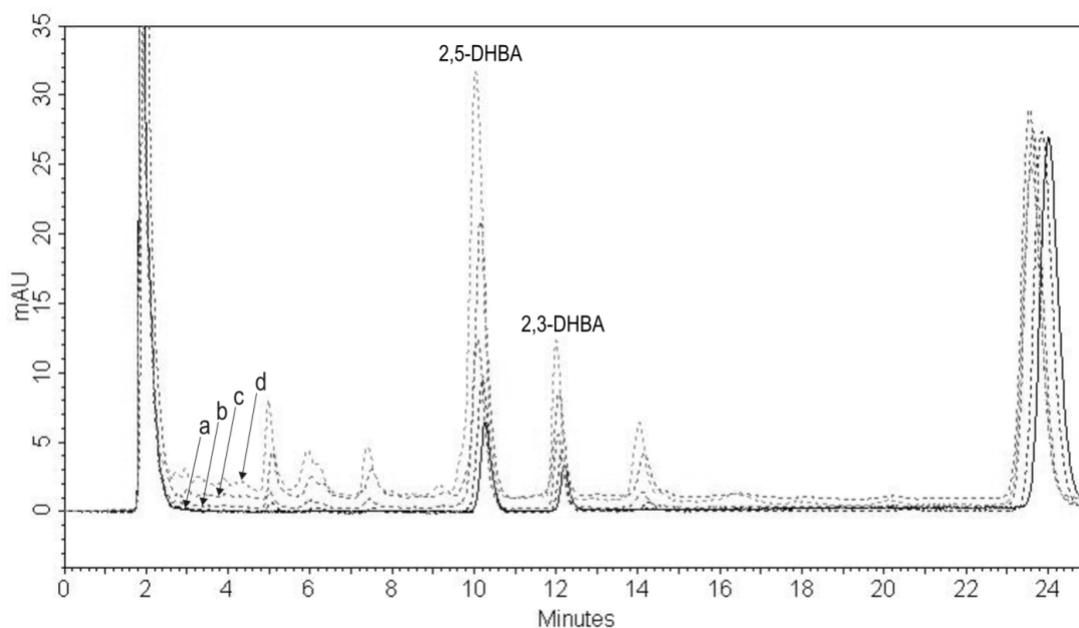


Figura 31 – Cromatograma do controle positivo (linha) sobreposto com vários cromatogramas das amostras tratadas com extrato liofilizado de chá-verde (pontilhados): (a) 135 µg; (b) 270 µg; (c) 540 µg e (d) 1350 µg. Leitura feita a 325 nm.

AKAGAWA e colaboradores (2003) observaram a produção de H_2O_2 causado por polifenóis, como as catequinas, quando incubados em pH e temperatura quase-fisiológicos (pH 7,4; 37 °C). O mesmo efeito foi observado por AOSHIMA e colaboradores (2006) quando o extrato de chá-verde era incubado em tampão fosfato pH 7,4 a 25 °C por um período de 24 horas. Porém ambos não propuseram mecanismo pelo qual é produzido o H_2O_2 . FURUKAWA e colaboradores (2003) sugerem que a produção de peróxido de hidrogênio ocorra por dismutação do radical ânion superóxido (O_2^-) gerado durante a auto-oxidação do EGCG mediado pelo metal de transição, em meio aquoso onde há presença de O_2 (Fig. 32).

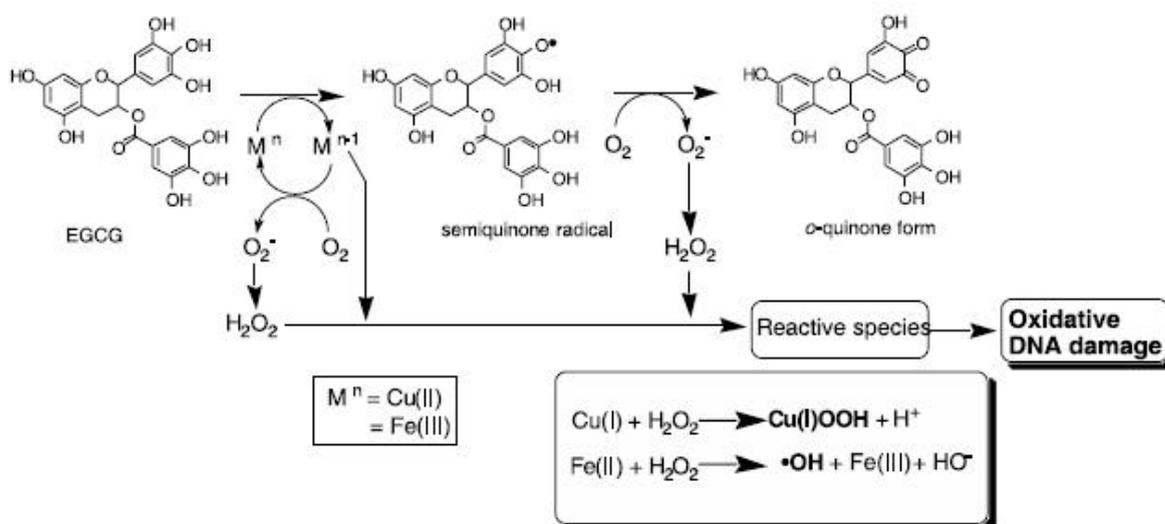


Figura 32 – Mecanismo proposto por FURUKAWA e colaboradores (2003) do dano oxidativo induzido por EGCG na presença de metais de transição.

Como o método descrito por OWEN ocorre em condições próximas às do descrito por AKAGAWA e colaboradores, ou seja, em tampão fosfato pH 6,5 a 37 °C por 3 horas, pode-se supor que o efeito pró-oxidante, para a geração de DHBA's, seja pela formação de H₂O₂ no meio reacional, independentemente de se adicionar a enzima xantina oxidase; também pela redução do Fe III, presente no tampão através da formação de quinonas, conforme proposto por AZAN e colaboradores (2004) e FURUKAWA e colaboradores (2003), conforme Figuras 32 e 33. Enfim, sugere-se que a formação do radical hidroxila ocorra através da reação de Fenton devido à formação de H₂O₂ e Fe II (BARREIROS *et al.*, 2006). Porém, mais estudos são necessários para confirmar esta sugestão, como por exemplo, dosear o H₂O₂ durante a incubação no mesmo tampão do ensaio enzimático no termoagitador.

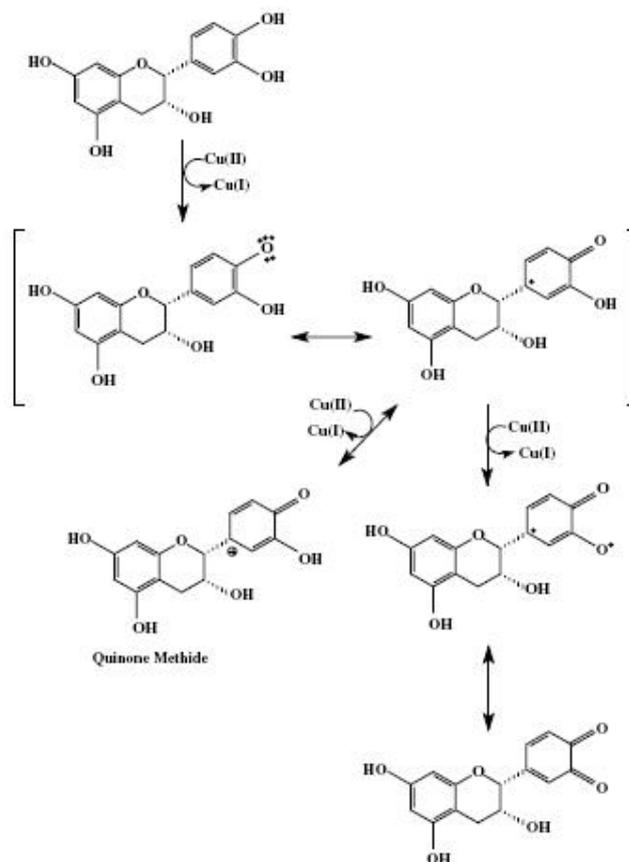


Figura 33 – Modelo proposto por AZAN e colaboradores (2004) na formação de quinonas mediado por Cu II.

O fato de que alguns componentes do chá-verde podem agir como pró-oxidantes não é de todo maléfico, pois vários autores têm atribuído a esta propriedade seu mecanismo anti-câncer (AZAN *et al.*, 2004). Estes autores sugerem efeito mais específico na indução da apoptose em células tumorais através da fragmentação de seu DNA, pela observação de cromatinas de células tumorais onde o nível de íons cobre estava mais elevado em comparação a outras células. Isto possibilita a formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO) através da auto-oxidação de seus componentes (como por exemplo: EGCG e EC) em sítios mais específicos, levando ao dano oxidativo no DNA de células malignas (FURUKAWA *et al.*, 2003; AZAN *et al.*, 2004).

6. CONCLUSÕES

- Os três sistemas de extração apresentaram rendimento superior a 30% em peso nos extratos liofilizados, sendo que o sistema 2 (extração assistida por ultra-som com solução extratora composta por H₂O:Me₂CO (1:1 V/V)) teve rendimento significativamente maior que o sistema 1 (extração por decocção assistida a 80 °C por 20 min.) e sistema 3 (extração assistida por ultra-som com solução extratora composta por H₂O:EtOH (75:25 V/V));
- O método analítico desenvolvido se mostrou exato, preciso e específico para quantificação de cafeína, catequina, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina e galato de galocatequina nas amostras de chá-verde;
- Não se conseguiu quantificar o ácido gálico devido à sua baixa concentração nas amostras, inferior à faixa linear testada;
- A análise estatística não mostrou diferença significativa ($\alpha = 0,05$) nos teores de catequinas totais (CT) entre as estações (primavera/verão);
- O método de extração pelo sistema 2, extração assistida por ultra-som com solução extratora composta por H₂O:Me₂CO (1:1 V/V), mostrou rendimento superior aos demais e, também, extraiu significativamente ($\alpha = 0,05$) mais galato de epigalocatequina (teor médio de 17,92%) e galato de epicatequina (teor médio de 4,82%);
- O teor de cafeína não se alterou significativamente entre os sistemas de extração (sistema 1: teor médio 5,68%, sistema 2: teor médio: 5,73% e sistema 3: teor médio 5,62%);
- O sistema 2, extração assistida por ultra-som com solução extratora composta por H₂O:Me₂CO (1:1 V/V) apresentou maior relação na extração de galatos de catequinas sobre a cafeína EGCG/CAF = 3,20, ECG/CAF = 0,86 e (EGCG+ECG)/CAF = 4,05 ($\alpha = 0,05$);

- O galato de epigallocatequina (EGCG) se mostrou, em relação às demais catequinas, com maior atividade antioxidante *in vitro*, pelo método fotolorimétrico do DPPH[·] com uma CE₅₀ de 4,19 µg/ml;
- As amostras do verão foram as que possuíram melhor atividade antioxidante *in vitro* pelo método fotolorimétrico do DPPH[·], sendo que as amostras obtidas pelo sistema 2 apresentaram maior atividade (amostra ECVB-V1B: CE₅₀ 8,33 µg/ml e amostra ECVB-V3B: CE₅₀ 8,41 µg/ml);
- Os teores dos componentes galato de epicatequina (ECG) e galato de epigallocatequina (EGCG) são as únicas catequinas que se correlacionaram com a atividade antioxidante *in vitro* pelo método fotolorimétrico do DPPH[·], com $r = -0,8241$ e $r = -0,8188$ respectivamente;
- O sistema 2, extração assistida por ultra-som com solução extratora composta por H₂O:Me₂CO (1:1 V/V), entre os métodos testados neste trabalho, é o melhor método de extração quando se deseja maior atividade antioxidante do extrato liofilizado por extrair significativamente melhor as catequinas com maior atividade antioxidante: galato de epicatequina (ECG) e galato de epigallocatequina (EGCG).
- Não foi possível concluir a atividade pró-oxidante do extrato liofilizado do chá-verde ou das substâncias de referência, nem foi possível definir um limiar de concentração para esta atividade, pelo ensaio enzimático do sistema hipoxantina/xantina oxidase.

7. REFERÊNCIAS

- AKAGAWA, M.; SHIGEMITSU, T.; SUYAMA, K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quase-physiological conditions. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.67, p.2632-40, 2003.
- ANDERSON, R. A.; POLANSKY, M. M. Tea enhances insulin activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.50, p.7182-6, 2002.
- AOSHIMA, H.; HIRATA, S.; AYABE, S. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. **Food Chemistry**, v.103, p.617-22, 2006.
- AZAN, A.; HADI, N.; KHAN, N.U.; HADI, S.M. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.555-61, 2004.
- BABU, P.V.A.; SABITHA, K.E.; SHYAMALADEVI, C.S. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.162, p.114-20, 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVI, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v.1, p.113-23, 2006.
- BONOLI, M.; PELILLO, M.; TOSCHI, T.G.; LERCKER, G. Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE. **Food Chemistry**, v.81, p.631-8, 2003.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie** v. 25, p.25-30, 1995.
- BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.
- BRONNER, W.E.; BEECHER, G.R. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.805, p.137-142, 1998.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier, 1996, p.885-6.
- BOWN, D. **Encyclopedia of Herbs and their uses**. New York: DK, 1995. p.99, 252.
- CABRERA, C.; GIMENEZ, R.; LOPEZ, M. C. Determination of tea components with antioxidant activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.51, p.4427-35, 2003.
- CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; TOMASSETTI, M. Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, p.725-36, 2003.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; CHEW, Y.L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. **Food Chemistry**, v.102, p.1214-22, 2007.

CHEN, Z.; ZHU, Q.Y.; TSANG, D.; HUANG, Y. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.477-82, 2001.

DALLUGE, J.J.; NELSON, B.C.; THOMAS, J.B.; SANDER, L.C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.793, p.265-74, 1998.

DALLUGE, J.J.; NELSON, B.C. Determination of tea catechins. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.411-24, 2000.

FERNÁNDEZ, P. L. PABLOS, F.; MARTÍN, M.J.; GONZÁLEZ, A.G. Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p1833-9, 2002.

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). **IL Farmaco**, v. 56, p.397-401, 2001.

FURUKAWA, A.; OIKAWA, S.; MURATA, M.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. **Biochemical Pharmacology**, v.66, p.1769-78, 2003.

GOSSLAU, A.; CHEN, K. Y. Nutraceuticals, Apoptosis, and Disease Prevention. **Nutrition**, v.20, p.95-102, 2004.

GOTO, T.; YOSHIDA, Y.; KISO, M.; NAGASHIMA, H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. **Journal of Chromatography A**, v.749, p.295-299, 1996.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Minireview: Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.2375-7, 1995.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Medical Microbiology**, v.50, p.299-302, 2001.

HAWTHORNE, S.B.; GRABANSKI, C.B.; MARTIN, E.; MILLER, D.J. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and supercritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v.892, p.421-33, 2000.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, p.89-143, 2003.

HUANG, K.C. **The Pharmacology of Chinese Herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

IAC – Instituto Agronômico de Campinas. Pesquisa de Cultivares de chás. Disponível em <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acesso em: 11.07.05.

IAC – CIIAGRO. Aptidão Climática da Cultura de Chá. Disponível em <<http://www.iac.sp.gov.br/ciiagro/zoneamento/cha.htm>>. Acesso em: 02.06.05.

ICH – Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

IKEDA, I.; KOBAYASHI, M.; HAMADA, T.; TSUDA, K.; GOTO, H.; IMAIZUMI, K.; NOZAWA, A.; SUGIMOTO, A.; KAKUDA, T. Heat-Epimerized Tea Catechins Rich in Gallocatechin Gallate and Catechin Gallate are More Effective to Inhibit Cholesterol Absorption than Tea Catechins Rich in Epigallocatechins Gallate and Epicatechin Gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.7303-07, 2003.

JUNEJA, L.R.; CHU, D.-C.; OKUBO, T.; NAGATO, Y.; YOKOGOSHI, H. L-theanine – a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.199-204, 1999.

KAWAI, K.; TSUNO, N.H.; KITAYAMA, J.; OKAJI, Y.; YAZAWA, K.; ASAKAGE, M.; HORI, N.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA, H. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.112, p.951-7, 2003.

KIRK-OTTMER: Encyclopedia of Chemical Technology, v.22, p.628-643, USA: John Wiley & Sons, 1983.

LIN, Y.-S.; TSAI, Y.-J.; TSAI, J.-S.; LIN, J.-K. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1864-73, 2003.

NANCE, C.; SHEARER, W. Is green tea good for HIV-1 infection? **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.112, p.851-3, 2003.

NEILSON, A. P.; GREEN, R. J.; WOOD, K. V.; FERRUZZI, M. G. High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v.1132, p.132-40, 2006.

NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y.M. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.675-85, 2004.

OWEN, R.W.; WIMONWATWATEE, T.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. A HPLC system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. **European Journal of Cancer**, v.5, p.233-40, 1996.

OWEN, R.W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v.36, p.1235-47, 2000.

PALERMO, C. M.; HERNANDO, J.I.M.; DERTINGER, S.D.; KENDE, A.S.; GASIEWICZ, T.A. Identification of Potencial Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists in Green Tea. **Chemical Research in Toxicology**, v.16, p.865-72, 2003.

PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing**, v.42, p.129-33, 2003.

PDR for Herbal Medicines. USA: Medical Economics Company, 2000.

PÉRES, V.F.; SAFFI, J.; MELECCHI, M.I.S.; ABAD, F.C.; JACQUES, R.A.; MARTINEZ, M.M.; OLIVEIRA, E.C.; CAMARÃO, E.B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v.1105, p.115-8, 2006

PERVA-UZUNALIC, A.; SKERGET, M.; KNEZ, Z.; WEINREICH, B.; OTTO, F.; GRUNER, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechin and caffeine. **Food Chemistry**, v.96, p.597-605, 2006.

PETERSON, J.; DWYER, J.; BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D.; HOLDEN, J.; ELDRIDGE, A.L.; BEECHER, G.; ALADESANMI, J. Major flavonoids in dry tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.487-501, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-80, 2004.

RIJKEN, P.J.; WISEMAN, S.A.; WEISGERBER, U.M.; VAN MIERLO, C.A.J.; QUINLAN, P.T.; VAN DE PUT, F. Antioxidant and Other Properties of Green and Black Tea. In: CADENAS, E.; PACKER, L. **Handbook of Antioxidants**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.19.

SABU, M.C.; SMITHA, K.; RAMADASAN, K. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.109-16, 2002.

SAITO, S. T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E. S.; BUENO, F. A Method for Fast Determination of Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin (C) and Caffeine (CAF) in Green Tea Using HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 394-400, 2006.

SAKAI, M.; COSTA, J.S. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. **Adução NPK do Chazeiro (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze), em Latossolo Amarelo Álico, no Vale do Ribeira, SP.Pariquera-Açu – SP, 1997. 60p. Tese (Doutorado) – Resumo. Disponível em <<http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=199710933002037003P0>>. Acesso em 11.07.05.**

SANTORO, A.M.C.V.; GUIMARÃES, L.O.C. Universidade de São Paulo. Instituto de Saúde Pública. **Teor de Flúor nos chás Industrializados no Brasil e seu Significado para a Saúde Bucal**, 1997. 99p. Dissertação (Mestrado) – Resumo.

Disponível em

<<http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=199723633002010067P7>>. Acesso em 11.07.05.

SATO, T.; MIYATA, G. The Nutraceutical Benefit, Part I: Green Tea. **Nutrition**, v.16, p.315-7, 2000.

SCHMIDT, M.; SCHMITZ, H.-J.; BAUMGART, A.; GUEDON, D.; NETSCH, M.I.; KREUTER, M.-H.; SCHMIDLIN, C.B.; SCHRENK, D. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.307-14, 2005.

SHARMA, V.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S.D.; KUMAR, V. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. **Journal of Composition and Analysis**, v.18, p.583-94, 2005.

SHIMADZU: Manual Shimadzu CLASS-VP™. Chromatography Data System. Instruction Manual. Version 6.1. Kyoto: Shimadzu Scientific Instrument, 2001.

SILVA, H.O.; NOBREGA, J.A. Universidade Federal de São Carlos. Instituto de Química. **Avaliação de Procedimentos de Extração Assistidos por Ultra-som Visando a Determinação de Al, Ca, Mg e Mn em chás**, 2003. 120p. Dissertação (Mestrado) – Resumo. Disponível em <<http://servicos.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=200339233001014005P5>>. Acesso em 11.07.05.

TOIT, R.; VOLSTEEDT, Y.; APOSTOLIDES, Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. **Toxicology**, v.166, p.63-9, 2001.

TREVISAN, M.T.S.; SILVA, M.G.V.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R.W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4378-82, 2006.

USP 29. The United States Pharmacopeia. 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechin, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v.68, p.115-21, 2000.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2nd ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WEISBURGER, J. H.; CHUNG, F. L. Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. **Food Chemichal Toxicology**, v.40, p.1145-54, 2002.

YAO, L.; JIANG, Y.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DUAN, J.; RAYMONT, K.; LISLE, A.; XU, Y. HPLC Analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chemistry**, v.84, p.253-63, 2004.

ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. **Talanta**, v.57, p.307-16, 2002

Anexo 1: Tabelas complementares

Tabela 40 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de AG - ácido gálico por CLAE-DAD, em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média absoluta	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3		
21	1174535	1207564	1243200	1208433	2,84
48	2752183	2703089	2740042	2731772	0,94
62	3509453	3478537	3609510	3532500	1,94
76	4288609	4271317	4354095	4304674	1,01
103	5857752	5801767	5880146	5846555	0,69

*média de 3 injeções

Tabela 41 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de C - catequina por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média absoluta	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3		
20	300151	302881	320820	307950	3,65
48	716345	694405	702488	704413	1,58
61	903045	893684	933815	910181	2,31
75	1112784	1098486	1116613	1109294	0,86
102	1499531	1496620	1534199	1510117	1,38

*média de 3 injeções

Tabela 42 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de CAF - cafeína por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média absoluta	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3		
37	2018762	1928548	2016711	1988007	2,59
87	4551639	4428356	4481943	4487313	1,38
111	5798841	5693513	5951033	5814462	2,23
136	7045981	6958878	7150223	7051694	1,36
186	9554379	9402970	9641578	9532976	1,27

*média de 3 injeções

Tabela 43 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de EC - epicatequina por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média absoluta	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3		
31	272530	267261	282196	273996	2,76
72	623173	608545	619778	617165	1,24
93	804497	777374	810623	797498	2,22
113	973041	960584	973527	969051	0,76
155	1312388	1309219	1354212	1325273	1,89

*média de 3 injeções

Tabela 44 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de ECG - galato de epicatequina por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média absoluta	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3		
41	910654	893197	950056	917969	3,17
95	2039615	1996953	2064519	2033696	1,68
123	2609948	2561503	2741174	2637542	3,52
150	3158512	3148466	3243172	3183383	1,63
204	4302812	4301332	4438963	4347702	1,82

*média de 3 injeções

Tabela 45 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de EGC - epigallocatequina por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média absoluta	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3		
99	321755	310987	331985	321576	3,27
231	753709	699795	725458	726321	3,71
297	959250	915551	964434	946412	2,84
363	1174256	1114934	1154091	1147760	2,63
495	1612417	1509675	1556489	1559527	3,30

*média de 3 injeções

Tabela 46 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de EGCG - galato de epigallocatequina por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média	DPR
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3	absoluta	interdia
156	2652148	2658022	2823046	2711072	3,58
364	6112072	6098105	6159185	6123121	0,52
467	7767813	7812049	8062439	7880767	2,02
571	9497927	9585541	9650427	9577965	0,80
779	12785322	13009299	13341331	13045317	2,14

*média de 3 injeções

Tabela 47 – Dados relativos à linearidade do método, obtidos durante realização da curva padrão de GCG - galato de galocatequina por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Concentração SQR (µg/ml)	Áreas absolutas			Área média	DPR interdia
	* Dia 1	* Dia 2	* Dia 3	absoluta	
21	368173	352843	386163	369060	4,52
49	843742	818086	833105	831644	1,55
62	1071862	1059824	1101257	1077648	1,98
76	1312386	1295283	1313113	1306927	0,77
104	1759245	1776357	1805164	1780255	1,30

*média de 3 injeções

Tabela 48 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do AG - ácido gálico, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	$3,60 \times 10^{13}$	$8,99 \times 10^{12}$	4472,24*	3,48
Regressão linear	1	$3,60 \times 10^{13}$	$3,60 \times 10^{13}$	17888,22*	4,96
Desvio de linearidade	3	$1,46 \times 10^9$	$4,85 \times 10^8$	0,24	3,71
Resíduo (dentro)	10	$2,01 \times 10^{10}$	$2,01 \times 10^9$		
Total	14				

*significativo para $p < 0,05$

Tabela 49 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da C - catequina, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	$2,41 \times 10^{12}$	$6,03 \times 10^{11}$	2476,38*	3,48
Regressão linear	1	$2,41 \times 10^{12}$	$2,41 \times 10^{12}$	9905,31*	4,96
Desvio de linearidade	3	$4,96 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7$	0,07	3,71
Resíduo	10	$2,44 \times 10^9$	$2,44 \times 10^8$		
Total	14				

*significativo para $p < 0,05$

Tabela 50 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da CAF - cafeína, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	9,53 x 10 ¹³	2,38 x 10 ¹³	2534,01*	3,48
Regressão linear	1	9,53 x 10 ¹³	9,53 x 10 ¹³	10135,05*	4,96
Desvio de linearidade	3	9,41 x 10 ⁹	3,14 x 10 ⁹	0,33	3,71
Resíduo	10	9,40 x 10 ¹⁰	9,40 x 10 ⁹		
Total	14				

*significativo para p<0,05

Tabela 51 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da EC - epicatequina, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	1,84 x 10 ¹²	4,61 x 10 ¹¹	2069,55*	3,48
Regressão linear	1	1,84 x 10 ¹²	1,84 x 10 ¹²	8277,58*	4,96
Desvio de linearidade	3	1,34 x 10 ⁸	4,46 x 10 ⁷	0,20	3,71
Resíduo	10	2,23 x 10 ⁹	2,23 x 10 ⁸		
Total	14				

*significativo para p<0,05

Tabela 52 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do ECG – galato de epicatequina, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	1,96 x 10 ¹³	4,91 x 10 ¹²	1251,22*	3,48
Regressão linear	1	1,96 x 10 ¹³	1,96 x 10 ¹³	5004,24*	4,96
Desvio de linearidade	3	2,51 x 10 ⁹	8,36 x 10 ⁸	0,21	3,71
Resíduo	10	3,92 x 10 ¹⁰	3,92 x 10 ⁹		
Total	14				

*significativo para p<0,05

Tabela 53 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da EGC – epigallocatequina, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	2,57 x 10 ¹²	6,41 x 10 ¹¹	627,01*	3,48
Regressão linear	1	2,57 x 10 ¹²	2,57 x 10 ¹²	2507,78*	4,96
Desvio de linearidade	3	2,80 x 10 ⁸	9,35 x 10 ⁷	0,09	3,71
Resíduo	10	1,02 x 10 ¹⁰	1,02 x 10 ⁹		
Total	14				

*significativo para p<0,05

Tabela 54 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do EGCG – galato de epigalocatequina, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	$1,78 \times 10^{14}$	$4,45 \times 10^{13}$	1858,39*	3,48
Regressão linear	1	$1,78 \times 10^{14}$	$1,78 \times 10^{14}$	7433,43*	4,96
Desvio de linearidade	3	$3,08 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9$	0,04	3,71
Resíduo	10	$2,40 \times 10^{11}$	$2,40 \times 10^{10}$		

Total

14

*significativo para $p < 0,05$

Tabela 55 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do GCG – galato de galocatequina, por CLAE-DAD em 280 nm, utilizando coluna C-18 (150 x 4,6 mm DI, 5 µm, 110 Å, Gemini), e fase móvel constituída de água: metanol: acetato de etila (850:130:22,5) acidificada a fase aquosa com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	FC	FT
Entre	4	$3,33 \times 10^{12}$	$8,32 \times 10^{11}$	2701,75*	3,48
Regressão linear	1	$3,33 \times 10^{12}$	$3,33 \times 10^{12}$	10806,35*	4,96
Desvio de linearidade	3	$1,96 \times 10^8$	$6,54 \times 10^7$	0,21	3,71
Resíduo	10	$3,08 \times 10^9$	$3,08 \times 10^8$		

Total

14

*significativo para $p < 0,05$

Tabela 56 – Valores experimentais obtidos na quantificação do DPPH[•] para avaliação da atividade antioxidante dos extratos, por espectrofotometria, em 515 nm.

	DPPH [•] inicial (µM)	Valores de DPPH [•] (µM) após tratamento	
		Média* ± DP	(DPR)
L(+)-ácido ascórbico			
	2,31ug/ml	169,90	145,15 ± 1,83 (1,26)
	4,62ug/ml	169,90	111,93 ± 1,01 (0,90)
	6,93ug/ml	169,90	79,06 ± 1,01 (1,28)
	9,24ug/ml	169,90	42,76 ± 1,23 (2,88)
	11,55ug/ml	169,90	18,69 ± 0,80 (4,26)
Ácido gálico			
	1,08µg/ml	169,90	168,98 ± 5,47 (3,24)
	1,62µg/ml	169,90	133,66 ± 0,14 (0,11)
	2,15µg/ml	169,90	130,30 ± 0,86 (0,66)
	3,23µg/ml	169,90	59,38 ± 2,02 (3,40)
	4,31µg/ml	169,90	22,46 ± 0,21 (0,94)
Catequina (C)			
	2,08µg/ml	171,61	154,57 ± 0,97 (0,63)
	4,16µg/ml	171,61	124,36 ± 4,26 (3,42)
	6,24µg/ml	171,61	114,86 ± 1,39 (1,21)
	8,32µg/ml	171,61	88,64 ± 0,48 (0,55)
	10,4µg/ml	171,61	54,14 ± 0,36 (0,67)

<i>(continuação)</i>		Valores de DPPH (μM) após tratamento	
	DPPH_{inicial} (μM)	Média* \pm DP (DPR)	
Epicatequina (EC)			
1,10 $\mu\text{g/ml}$	169,90	139,57 \pm 0,50 (0,35)	
3,30 $\mu\text{g/ml}$	169,90	110,00 \pm 7,34 (6,68)	
4,39 $\mu\text{g/ml}$	169,90	103,13 \pm 6,27 (6,08)	
7,69 $\mu\text{g/ml}$	169,90	68,90 \pm 0,20 (0,29)	
9,89 $\mu\text{g/ml}$	169,90	39,85 \pm 0,70 (1,76)	
Epigalocatequina (EGC)			
2,09 $\mu\text{g/ml}$	171,61	147,68 \pm 2,25 (1,52)	
4,19 $\mu\text{g/ml}$	171,61	118,08 \pm 3,16 (2,68)	
6,28 $\mu\text{g/ml}$	171,61	100,26 \pm 0,61 (0,61)	
8,37 $\mu\text{g/ml}$	171,61	75,56 \pm 1,49 (1,97)	
10,47 $\mu\text{g/ml}$	171,61	45,15 \pm 1,24 (2,76)	
Galato de epicatequina (ECG)			
2,15 $\mu\text{g/ml}$	171,61	135,12 \pm 15,58 (11,53)	
4,29 $\mu\text{g/ml}$	171,61	106,37 \pm 2,68 (2,52)	
6,44 $\mu\text{g/ml}$	171,61	77,63 \pm 1,95 (2,51)	
8,59 $\mu\text{g/ml}$	171,61	39,93 \pm 2,50 (5,64)	
10,73 $\mu\text{g/ml}$	171,61	14,80 \pm 1,70 (11,51)	
Galato de epigalocatequina (EGCG)			
1,04 $\mu\text{g/ml}$	171,61	158,10 \pm 1,34 (0,85)	
2,08 $\mu\text{g/ml}$	171,61	123,24 \pm 8,03 (6,52)	
4,16 $\mu\text{g/ml}$	171,61	83,05 \pm 0,36 (0,44)	
6,24 $\mu\text{g/ml}$	171,61	75,56 \pm 1,49 (1,97)	
Galato de galocatequina (GCG)			
2,16 $\mu\text{g/ml}$	171,61	143,98 \pm 1,09 (0,76)	
4,32 $\mu\text{g/ml}$	171,61	98,97 \pm 1,22 (1,23)	
6,48 $\mu\text{g/ml}$	171,61	59,90 \pm 0,24 (0,41)	
8,64 $\mu\text{g/ml}$	171,61	25,65 \pm 2,19 (8,54)	
ECVB-V1A			
6,61 $\mu\text{g/ml}$	171,61	141,64 \pm 5,63 (3,97)	
9,92 $\mu\text{g/ml}$	171,61	111,16 \pm 1,32 (1,18)	
13,23 $\mu\text{g/ml}$	171,61	82,69 \pm 1,96 (2,37)	
16,53 $\mu\text{g/ml}$	171,61	62,65 \pm 1,68 (2,67)	
19,84 $\mu\text{g/ml}$	171,61	46,06 \pm 0,72 (1,56)	
ECVB-V2A			
6,44 $\mu\text{g/ml}$	171,61	140,62 \pm 4,19 (2,98)	
9,66 $\mu\text{g/ml}$	171,61	120,90 \pm 0,96 (0,79)	
16,11 $\mu\text{g/ml}$	171,61	83,31 \pm 2,35 (2,82)	
19,33 $\mu\text{g/ml}$	171,61	58,75 \pm 2,39 (4,06)	
ECVB-V3A			
6,78 $\mu\text{g/ml}$	171,61	140,28 \pm 0,36 (0,26)	
10,18 $\mu\text{g/ml}$	171,61	120,67 \pm 1,10 (0,91)	
13,57 $\mu\text{g/ml}$	171,61	98,71 \pm 0,23 (0,24)	
16,96 $\mu\text{g/ml}$	171,61	73,26 \pm 2,72 (3,71)	
20,35 $\mu\text{g/ml}$	171,61	51,19 \pm 0,43 (0,83)	

(continuação)

Valores de DPPH (μM) após tratamento

	DPPH _{inicial} (μM)	Média* \pm DP (DPR)
ECVB-P1A		
6,19 $\mu\text{g/ml}$	171,61	124,66 \pm 0,35 (0,28)
12,37 $\mu\text{g/ml}$	171,61	94,64 \pm 0,12 (0,12)
15,47 $\mu\text{g/ml}$	171,61	88,00 \pm 0,95 (1,08)
18,56 $\mu\text{g/ml}$	171,61	69,65 \pm 1,84 (2,64)
ECVB-P2A		
5,03 $\mu\text{g/ml}$	171,61	153,43 \pm 1,65 (1,08)
7,55 $\mu\text{g/ml}$	171,61	138,42 \pm 1,18 (0,85)
10,07 $\mu\text{g/ml}$	171,61	119,91 \pm 0,23 (0,20)
12,59 $\mu\text{g/ml}$	171,61	108,90 \pm 2,02 (1,86)
15,10 $\mu\text{g/ml}$	171,61	89,17 \pm 3,26 (3,66)
ECVB-P3A		
6,49 $\mu\text{g/ml}$	171,61	144,01 \pm 2,03 (1,41)
9,73 $\mu\text{g/ml}$	171,61	114,80 \pm 4,31 (3,75)
12,97 $\mu\text{g/ml}$	171,61	83,31 \pm 1,61 (1,94)
16,21 $\mu\text{g/ml}$	171,61	66,88 \pm 1,18 (1,77)
19,46 $\mu\text{g/ml}$	171,61	48,85 \pm 2,03 (4,17)
ECVB-V1B		
2,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	135,95 \pm 3,21 (2,36)
6,40 $\mu\text{g/ml}$	169,90	101,21 \pm 0,10 (0,10)
8,53 $\mu\text{g/ml}$	169,90	80,73 \pm 3,53 (4,37)
14,93 $\mu\text{g/ml}$	169,90	32,72 \pm 1,21 (3,69)
ECVB-V2B		
4,33 $\mu\text{g/ml}$	169,90	121,11 \pm 2,46 (2,03)
6,50 $\mu\text{g/ml}$	169,90	118,45 \pm 0,78 (0,65)
8,66 $\mu\text{g/ml}$	169,90	95,20 \pm 0,26 (0,27)
10,83 $\mu\text{g/ml}$	169,90	85,32 \pm 0,00 (0,00)
12,86 $\mu\text{g/ml}$	169,90	63,71 \pm 0,26 (0,41)
ECVB-V3B		
2,14 $\mu\text{g/ml}$	169,90	145,22 \pm 0,72 (0,50)
6,43 $\mu\text{g/ml}$	169,90	97,65 \pm 1,09 (1,11)
8,56 $\mu\text{g/ml}$	169,90	77,42 \pm 1,11 (1,43)
14,98 $\mu\text{g/ml}$	169,90	32,81 \pm 1,08 (3,31)
ECVB-P1B		
4,29 $\mu\text{g/ml}$	169,90	133,37 \pm 5,31 (3,98)
6,43 $\mu\text{g/ml}$	169,90	108,20 \pm 1,29 (1,20)
8,58 $\mu\text{g/ml}$	169,90	87,21 \pm 2,29 (2,62)
10,72 $\mu\text{g/ml}$	169,90	72,26 \pm 0,56 (0,77)
12,86 $\mu\text{g/ml}$	169,90	51,63 \pm 0,26 (0,50)
ECVB-P2B		
4,63 $\mu\text{g/ml}$	171,61	149,01 \pm 2,48 (1,66)
6,94 $\mu\text{g/ml}$	171,61	122,91 \pm 0,71 (0,57)
9,26 $\mu\text{g/ml}$	171,61	110,24 \pm 3,54 (3,21)
11,57 $\mu\text{g/ml}$	171,61	96,56 \pm 2,60 (2,70)
13,89 $\mu\text{g/ml}$	171,61	79,72 \pm 0,50 (0,63)

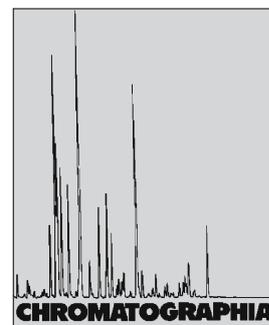
<i>(continuação)</i>		Valores de DPPH (μM) após tratamento	
	DPPH_{inicial} (μM)	Média* \pm DP (DPR)	
ECVB-P3B			
	4,76 $\mu\text{g/ml}$	171,61	136,64 \pm 2,26 (1,66)
	7,14 $\mu\text{g/ml}$	171,61	109,29 \pm 0,35 (0,32)
	9,51 $\mu\text{g/ml}$	171,61	94,06 \pm 1,80 (1,92)
	11,89 $\mu\text{g/ml}$	171,61	83,44 \pm 0,58 (0,70)
	14,27 $\mu\text{g/ml}$	171,61	64,60 \pm 1,08 (1,68)
ECVB-V1C			
	8,06 $\mu\text{g/ml}$	169,90	149,95 \pm 0,93 (0,62)
	10,75 $\mu\text{g/ml}$	169,90	125,60 \pm 10,58 (8,42)
	13,44 $\mu\text{g/ml}$	169,90	101,00 \pm 3,68 (3,64)
	16,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	70,48 \pm 3,95 (5,61)
ECVB-V2C			
	5,33 $\mu\text{g/ml}$	169,90	160,55 \pm 17,40 (10,84)
	8,00 $\mu\text{g/ml}$	169,90	158,15 \pm 0,60 (0,38)
	10,67 $\mu\text{g/ml}$	169,90	138,01 \pm 14,76 (10,69)
	13,33 $\mu\text{g/ml}$	169,90	106,51 \pm 1,67 (1,57)
	16,00 $\mu\text{g/ml}$	169,90	81,90 \pm 1,39 (1,70)
ECVB-V3C			
	8,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	151,79 \pm 2,78 (1,83)
	10,84 $\mu\text{g/ml}$	169,90	126,49 \pm 4,31 (3,41)
	13,55 $\mu\text{g/ml}$	169,90	107,88 \pm 0,56 (0,52)
	16,26 $\mu\text{g/ml}$	169,90	83,08 \pm 0,00 (0,00)
ECVB-P1C			
	8,38 $\mu\text{g/ml}$	169,90	131,64 \pm 1,12 (0,85)
	11,18 $\mu\text{g/ml}$	169,90	114,78 \pm 2,05 (1,79)
	13,97 $\mu\text{g/ml}$	169,90	97,45 \pm 3,62 (3,71)
	16,77 $\mu\text{g/ml}$	169,90	68,31 \pm 1,11 (1,63)
ECVB-P2C			
	8,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	157,59 \pm 2,37 (1,50)
	10,84 $\mu\text{g/ml}$	169,90	122,06 \pm 5,57 (4,56)
	13,55 $\mu\text{g/ml}$	169,90	105,03 \pm 2,37 (2,25)
	16,26 $\mu\text{g/ml}$	169,90	79,14 \pm 2,23 (2,81)
ECVB-P3C			
	5,21 $\mu\text{g/ml}$	169,90	153,66 \pm 7,38 (4,80)
	7,81 $\mu\text{g/ml}$	169,90	134,66 \pm 3,34 (2,48)
	10,41 $\mu\text{g/ml}$	169,90	116,35 \pm 5,29 (4,55)
	13,01 $\mu\text{g/ml}$	169,90	99,62 \pm 6,12 (6,15)
	15,62 $\mu\text{g/ml}$	169,90	72,74 \pm 2,37 (3,25)
EACN1A			
	8,05 $\mu\text{g/ml}$	169,90	141,60 \pm 3,38 (2,39)
	12,08 $\mu\text{g/ml}$	169,90	125,12 \pm 2,78 (2,22)
	16,11 $\mu\text{g/ml}$	169,90	99,33 \pm 0,12 (0,12)
	20,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	85,35 \pm 2,04 (2,39)
	24,16 $\mu\text{g/ml}$	169,90	62,43 \pm 2,78 (4,45)

<i>(continuação)</i>		Valores de DPPH' (μM) após tratamento	
	DPPH' inicial (μM)	Média* \pm DP (DPR)	
EACN3A			
8,05 $\mu\text{g/ml}$	169,90	121,02 \pm 3,98 (3,29)	
12,08 $\mu\text{g/ml}$	169,90	79,60 \pm 4,35 (5,46)	
16,11 $\mu\text{g/ml}$	169,90	42,59 \pm 3,01 (7,06)	
20,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	30,40 \pm 3,38 (11,12)	
24,16 $\mu\text{g/ml}$	169,90	15,63 \pm 1,33 (8,50)	
EACI4A			
8,11 $\mu\text{g/ml}$	169,90	132,89 \pm 4,35 (3,27)	
12,16 $\mu\text{g/ml}$	169,90	113,93 \pm 0,24 (0,21)	
16,21 $\mu\text{g/ml}$	169,90	87,45 \pm 2,17 (2,48)	
20,27 $\mu\text{g/ml}$	169,90	73,33 \pm 1,45 (1,98)	
24,32 $\mu\text{g/ml}$	169,90	58,84 \pm 3,02 (5,13)	
EACI5A			
8,05 $\mu\text{g/ml}$	169,90	166,45 \pm 31,04 (18,65)	
12,08 $\mu\text{g/ml}$	169,90	114,27 \pm 5,71 (4,99)	
16,11 $\mu\text{g/ml}$	169,90	100,35 \pm 7,61 (7,58)	
20,13 $\mu\text{g/ml}$	169,90	82,96 \pm 2,57 (3,10)	
24,16 $\mu\text{g/ml}$	169,90	59,90 \pm 3,54 (5,91)	

* Média de 3 análises.

Anexo 2: artigo publicado na Revista Chromatographia

Full Validation of a Simple Method for Determination of Catechins and Caffeine in Brazilian Green Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) Using HPLC



2007, 65, 607–610

S. T. Saito, P. E. Fröhlich, G. Gosmann✉, A. M. Bergold

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil; E-Mail: grace.gosmann@ufrgs.br

Received: 6 December 2006 / Revised: 17 January 2007 / Accepted: 22 January 2007
Online publication: 13 February 2007

Abstract

This paper describes the validation of an HPLC method for the assay of a green tea brew. The method employs a RP-18 column with water:methanol:ethyl acetate elution and UV detection at 280 nm. Specificity was evaluated using a photodiode array detector. The validation data showed that the assay is specific, accurate, precise, and reproducible for determination of six catechins and caffeine simultaneously. The response was linear over a range of 37–185 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for caffeine, 99–500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (–)-epigallocatechin (EGC), 20–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (+)-catechin (C), 30–150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (–)-epicatechin (EC), 150–800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (–)-epigallocatechin gallate (EGCG), 20–105 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (–)-gallocatechin gallate (GCG) and 40–205 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (–)-epicatechin gallate (ECG) ($r > 0.9999$ for all compounds). The range of recoveries was 96.12–110.48% according to substances. The RSD values for intra- and inter-day precision studies were <2.07 and <6.65%, respectively. The composition of samples assayed suggests that the summer is the best season for extract a major content of EGCG and caffeine. This assay can be readily utilized as quality controlled method for major green tea compounds.

Keywords

Column liquid chromatography
Validation
Brazilian green tea
Catechin
Caffeine

Introduction

Tea is the second most popular beverage worldwide and a major source of dietary flavonoids [1]. Recent studies have shown that tea confers great beneficial effects to the health of consumers, including the effects of reduction of cholesterol, enhancing insulin activity, immunostimulatory, antimicrobial and

antioxidant activities, protection against cardiovascular disease and cancer [2]. Tea polyphenols, especially catechins and phenolic acids, have been considered the main players in these beneficial effects on the human health [2, 3]. EGCG (epigallocatechin gallate), an isolated compound of green tea, has shown an important activity in HIV-1 therapy [4, 5].

Many factors can constitute important influence on the composition of tea, such as species, season, age of the leaf, climate, and horticultural practices (soil, water, minerals, fertilizers) [6, 7].

The cultivation of *Camellia sinensis* var. *assamica* in Brazil is restricted to Vale do Ribeira in the State of São Paulo, where most of the harvest is used for the black tea production [8]. Recently, Brazilian farmers have started to produce green tea as well, in order to supply the new coming market, using that same variety. The var. *assamica* is generally not used for green tea production because its much greater flavanols content would result in a brew that could be more bitter than var. *sinensis*. The flavonols content of var. *assamica* is more than twice that of var. *sinensis* [9] of which 60–80% of the total flavonoids are catechins [10]. These catechins contribute to the characteristic bitter and astringent taste of tea [11, 12]. Studies of Brazilian green tea (var. *assamica*) in literature are currently scarce [6].

Routine quality control methods have recently become very important for determining tea quality due to its pharmacological importance and application in the food and pharmaceutical industry [13].

Several analytical methods to quantify catechins and/or methylxanthines using HPLC have been reported. Most of them use gradient elution [13–15] employing complex mobile phases or other difficult conditions to reproduce the method. Other techniques like capillary electrophoresis (CZE and MEKC)

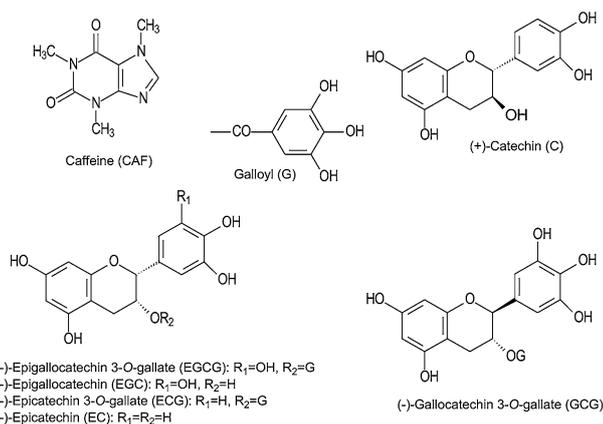


Fig. 1. Chemical structures of the green tea components assayed

Table 1. Statistical data for calibration plots ($P < 0.05$)

	CAF	EGC	C	EC	EGCG	GCG	ECG
Number of data points	5	5	5	5	5	5	5
Range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	37–185	99–500	20–100	30–150	150–800	20–105	40–205
Slope	50,908	3,134	14,721	8,499	16,586	16,969	20,989
Intercept	105,050	9,878	5,830	7,810	114,693	13,611	50,309
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3.2	0.4	0.3	0.6	4.2	1.4	1.7
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10.9	20.7	3.4	12.1	43.2	14.4	14.3
Correlation coefficient (r)	0.9999	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9999

Results derived from linear regression analysis of standard chromatogram peak area plotted versus standard concentration. Absorbance was measured at 280 nm

have been developed recently but their utilization in routine analysis is limited [3, 13].

The aim of this paper was to develop and validate a simple and precise HPLC method to quantify caffeine (CAF), (-)-epigallocatechin (EGC), (+)-catechin (C), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-gallocatechin gallate (GCG) and (-)-epicatechin gallate (ECG) (Fig. 1) in Brazilian green tea harvested in different months of the year. It was also possible to show the profile of the flavanols content of these samples.

Experimental

Plant Material

Brazilian green tea leaves (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) were harvested between spring to summer in Vale do Ribeira in the State of São Paulo, Brazil. The samples were named as sum1 (harvest in 1 February 2005), sum2 (16 January 2006), sum3 (1 March 2006), sprin1 (1 October 2005), sprin2 (1 October 2005), and sprin3 (5 November 2005).

Extraction

Grounded tea leaves (2.5 g) were soaked in 100 mL of H₂O (80 °C) for 20 min [16] and then centrifuged at 3,500 rpm (2,000g) for 5 min. The supernatant was filtered into a 200 mL volumetric flask and adding 200 μL of glacial acetic acid in order to stabilize the polyphenols components then completing with H₂O. The aqueous extract was filtered through a 0.45 μm Millipore filter before the injection in HPLC system.

Chemicals and Reagents

Methanol (MeOH) (LC grade), ethyl acetate (EtOAc) (LC grade) and *ortho*-phosphoric acid were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Gallic acid (AG) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Caffeine (CAF) (>99%) was obtained from Nuclear (São Paulo, SP, Brazil). (+)-catechin (C) (>98%), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC) (>98%), (-)-epicatechin gallate (ECG) (>98%), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) (>95%), (+)-gallocatechin gallate (GCG) (>98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis,

MO, USA). Ultra-pure water (H₂O) was obtained by Milli-Q plus system from Millipore (Billerica, MA, USA). Stock solutions of these standards in mobile phase were stored for at least 3 months at 4 °C (none of these solutions exhibited any measurable deterioration under these conditions).

Chromatographic Conditions

The analysis was performed on a Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10ADvp equipped with a SPD-M10Avp diode array detector, a DGU-14A degasser, a SCL-10Avp system controller and Class-VP v.6.14 chromatography data system. A Gemini[®] RP-18 column (150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm , 110 Å) protected by a pre-column RP-18, both from Phenomenex (Torrance, CA, USA), was used throughout this study. The mobile phase was composed of H₂O:MeOH: EtOAc (850:130:22.5 v/v/v) and the aqueous phase was adjusted to pH 2.25 with *ortho*-phosphoric acid 20%. It was employed a flow rate of 1.7 mL min⁻¹, an injection volume of 20 μL and peaks were detected at 280 nm.

Calibration Curves

Solutions of CAF (198 $\mu\text{g mL}^{-1}$), EGC (528 $\mu\text{g mL}^{-1}$), C (109 $\mu\text{g mL}^{-1}$), EC (165 $\mu\text{g mL}^{-1}$), EGCG (831 $\mu\text{g mL}^{-1}$), GCG (111 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and ECG (218 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in the mobile phase. Less concentrated solutions were prepared by dilution in the mobile phase as Table 1.

The specificity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediary precision) and robustness were evaluated according to guidelines [17, 18]. Each calibration curve used five concentrations of caffeine and catechins standards (Table 1) and the results represent the average of three injections of each concentration. Linearity of the calibration curves was tested by ANOVA and linear regression analysis. Recovery (R) was calculated as $R = 100 (C_{\text{found}} - C_{\text{initial}})/C_{\text{added}}$, where C_{found} was the concentration in spiked samples. The precision and accuracy are expressed in terms of relative standard deviations (RSD) from mean intra- and inter-day assays and recovery of the theoretical concentration, respectively. The

chromatographic parameters as retention time, resolution, theoretical plate number, tailing factor and retention factor were calculated (data not shown).

Results and Discussion

A method based on reversed phase liquid chromatography combined with UV spectrometric detection was developed to quantify catechins and caffeine in *C. sinensis* var *assamica*. The method described here uses low pH aqueous MeOH:EtOAc mobile phase and it is very useful for routine analysis, considering that it is a simple, fast and precise isocratic HPLC method. The addition of very small amount of ethyl acetate in the aqueous mobile phase was important to determine an efficient resolution between the peaks of CAF and EGC. This assay can be readily utilized as quality control method for Brazilian green tea preparations considering their use in food and pharmaceutical industry.

In order to obtain the identification of peaks, retention time (Fig. 2a) and UV spectra, similarity index of the authentic standards and the sample were compared. Therefore, a sample was spiked with the standards to confirm the peak identification (Fig. 2b), because retention time of the standards and of the sample could differ when the sample has a complex matrix. UV spectra similarity indexes of the sample were above 0.99 for all peaks assayed, indicating good similarity with the standards (data not shown). Peak purity test was performed using photodiode array analysis to confirm that each peak of the six catechins and caffeine was attributable to a single component. The peak purity values for each compound were: CAF = 0.999929; EGC = 0.999990; C = 0.998148; EC = 0.999632; EGCG = 0.999976; GCG = 0.95557, indicating good purity for all peaks.

Effects of fluctuations on the pH of the mobile phase and wavelength detection were examined. Results indicate that the method is not affected by using pH 2.5 or detection at 275 nm (data not shown).

Calibration curves proved to be linear over the range showed in Table 1 using linear regression that resulted in $r > 0.9999$ for every compound assayed. The data were evaluated using ANOVA ($P < 0.05$). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ)

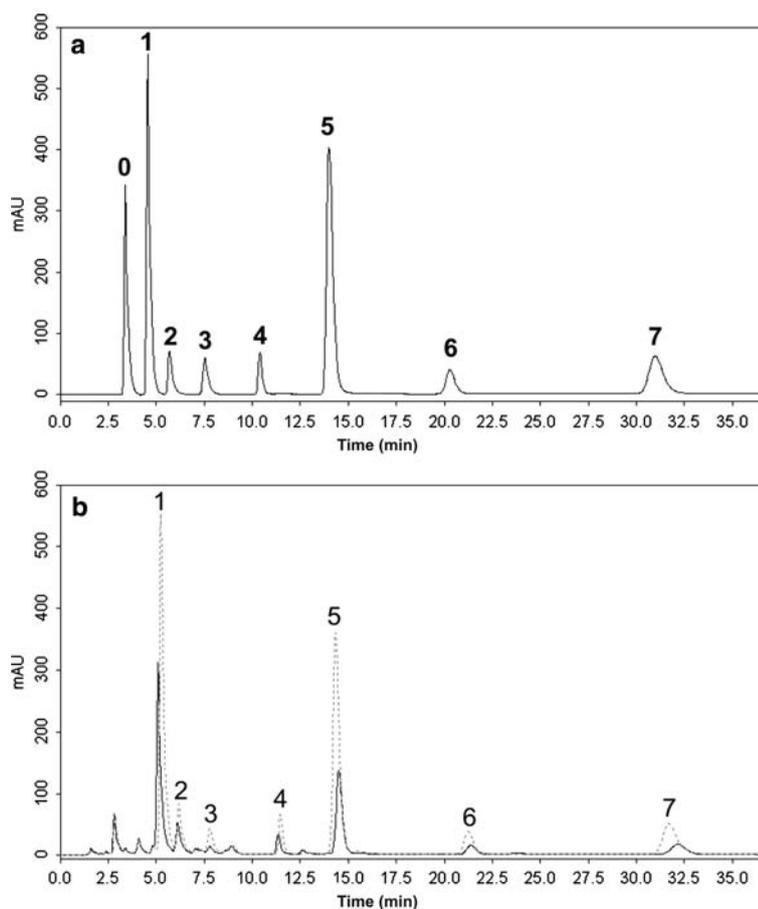


Fig. 2. a HPLC Chromatogram of standard solutions. 0 AG ($t_R = 3.38$) $76 \mu\text{g mL}^{-1}$; 1 = CAF ($t_R = 4.55$) $136 \mu\text{g mL}^{-1}$; 2 = EGC ($t_R = 5.68$) $363 \mu\text{g mL}^{-1}$; 3 = C ($t_R = 7.53$) $75 \mu\text{g mL}^{-1}$; 4 = EC ($t_R = 10.39$) $113 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5 = EGCG ($t_R = 13.99$) $571 \mu\text{g mL}^{-1}$; 6 = GCG ($t_R = 20.29$) $76 \mu\text{g mL}^{-1}$; 7 = ECG ($t_R = 30.97$) $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. UV detection at 280 nm. b Overlay of HPLC chromatogram sample sum1 ($2,002 \mu\text{g mL}^{-1}$) (solid line) and spiked sample with standards (dot line): 1 = CAF, 2 = EGC, 3 = C, 4 = EC, 5 = EGCG, 6 = GCG and 7 = ECG. UV detection at 280 nm

were calculated based on the standard deviation (SD) and the slope of the calibration curve [17] (Table 1). Precision of the HPLC method was evaluated through the determination of the repeatability and intermediary precision. The intra-day and inter-day precisions were estimated from the triplicate injections of solutions from sample named sum1 prepared at three levels of concentration and analyzed on three different days. According to the RSD values obtained for the nine samples evaluated on the same day, it could be observed that the chromatographic system showed a satisfactory response for all compounds (CAF 0.73%, EGC 0.90%, C 2.30%, EC 0.81%, EGCG 1.01%, GCG 1.16%, ECG 2.07%). For inter-day assay, RSD is generally $< 5\%$ for all compounds assayed. The relative low RSD (%) for most catechins and caffeine in intra-day and inter-day experiments

indicate that this method is both, repeatable and reproducible. Accuracy was evaluated through recovery studies by adding known amounts of reference substances to the solutions of sample sum1 using two concentration levels. Each solution was prepared in triplicate. The method showed recovery between 96.12 and 110.48% with RSD $< 5\%$, demonstrating the low interference of the matrix onto the recovery of all compounds analyzed.

Composition of Brazilian Green Tea Infusions

Brazilian green tea had shown a heterogeneous composition of catechins and caffeine (Table 2) between the seasons assayed. The lowest variation was showed in ECG followed by EGC and

Table 2. Composition (dry weight% \pm SD) of major components in tea infusions measured by HPLC-DAD analysis

	CAF (%)	EGC (%)	C (%)	EC (%)	EGCG (%)	GCG (%)	ECG (%)	CT ^a (%)
Sum1	1.60 \pm 0.035	4.75 \pm 0.177	0.31 \pm 0.002	0.92 \pm 0.041	4.57 \pm 0.063	0.14 \pm 0.018	1.13 \pm 0.049	11.82
Sum2	2.18 \pm 0.040	4.46 \pm 0.042	0.42 \pm 0.007	1.06 \pm 0.022	3.96 \pm 0.151	0.24 \pm 0.011	1.24 \pm 0.012	11.38
Sum3	2.46 \pm 0.032	2.76 \pm 0.006	0.22 \pm 0.002	0.59 \pm 0.004	5.18 \pm 0.069	0.13 \pm 0.008	1.13 \pm 0.038	10.01
Sprin1	1.21 \pm 0.017	4.46 \pm 0.177	0.19 \pm 0.009	0.74 \pm 0.030	3.54 \pm 0.137	0.12 \pm 0.015	0.77 \pm 0.026	9.82
Sprin2	1.31 \pm 0.025	4.44 \pm 0.030	0.50 \pm 0.010	1.15 \pm 0.015	2.84 \pm 0.022	0.08 \pm 0.001	0.84 \pm 0.003	9.85
Sprin3	1.56 \pm 0.001	3.37 \pm 0.025	0.28 \pm 0.004	0.54 \pm 0.004	4.23 \pm 0.005	0.06 \pm 0.001	1.02 \pm 0.027	9.50
Summer mean	2.080 ^b	3.990	0.316	0.856	4.570 ^b	0.170	1.166	11.07
Spring mean	1.362	4.090	0.323	0.810	3.536	0.086	0.876	9.723
<i>t</i> ^c	4.367	0.3683	0.1345	0.6196	20.42	1.981	3.191	3.062

Each sample values are reported as mean obtained from two infusions per each sample

^a Total catechins

^b Significant difference

^c Compared between seasons by Student *t*-test, $P < 0.05$. $t_{\text{critical}} = 4.30$

EGCG. The caffeine content was lower in the spring if compared to the summer samples. EGC together with EGCG were the major catechins found in spring samples. Summer samples had significant higher content of EGCG and caffeine when compared to spring samples (*t*-Student $P < 0.05$). Otherwise there is no significant variation between the seasons for the other catechins.

Conclusion

A simple, specific, precise, accurate, rapid and reproducible RP-LC method has been developed to quantify six catechins and caffeine in Brazilian green tea infusions (*Camellia sinensis* var. *assamica*). According to the validation procedure, this is an appropriate method for the quality control of major green tea contents that can be used by pharmaceutical and food industries. The composition of samples assayed suggests that the summer is the best season to extract a major content of EGCG and caffeine.

Acknowledgments

This research was supported by LAPPS (UFRGS) and CNPq (Brazil). The authors would like to thank Indústria de Chá Ouro Preto (SP, Brazil) for the kind delivery of Brazilian green tea samples.

References

- Rijken PJ, Wiseman SA, Weisgerber U M, van Mierlo CAJ, Quinlan PT, va de Put F, Balentine DA, Paetau-Robinson I (2000) Antioxidant and other properties of green and black tea. In: Cadenas E, Packer L (eds) Handbook of antioxidants. Marcel Dekker, New York, pp 371–399
- Zaveri NT (2006) Life Sci 78:2073–2080
- Zuo Y, Chen H, Deng Y (2002) Talanta 57:307–316
- Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, Hori N, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H (2003) J Allergy Clin Immunol 112(5):951–957
- Williamson MP, McCormick TG, Nance CL, Shearer WT (2006) J Allergy Clin Immunol doi:10.1016/j.jaci.2006.08.16
- Fernandez PL, Pablos F, Martín MJ, González AG (2002) J Agric Food Chem 50:1833–1839
- Lin Y, Tsai Y, Tsai J, Lin J (2003) J Agric Food Chem 51:1864–1873
- Saito ST, Welzel A, Suyenaga ES, Bueno F (2006) Ciênc Technol Aliment 26:394–400
- Takeo T (1992) In: Willson KN, Clifford MN (eds) Tea: cultivation to consumption. Chapman & Hall, Suffolk
- Higdon JV, Frei B (2003) Crit Rev Food Sci 43:89–143
- Tang S, Sheehan D, Buckley DJ, Morrissey PA, Kerry JP (2001) Int J Food Sci Tech 36:685–692
- Lesschaeve I, Noble AC (2005) Am J Clin Nutr 81(suppl 1):330s–335s
- Sharma V, Gulati A, Ravindranath SD, Kumar V (2005) J Food Comp Anal 18:583–594
- Goto T, Yoshida Y, Kiso M, Nagashima H (1996) J Chromatogr A 749:295–299
- Nishitani E, Sagesaka YM (2004) J Food Comp Anal 17:675–685
- Perva-Uzunalic A, Skerget M, Knez Z, Weinreich B, Otto F, Gruner S (2005) Food Chem 96(4):597–605
- ICH (2005) International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1)
- FDA (1994) Center for drug evaluation and research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods, Rockville