UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

CINTHIA INDY TAMAYOSE

**Determinação da Atividade Antirradicalar e da
Constituição Química de Infusões de Chás**

Versão corrigida conforme Resolução CoPGr – 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

12/11/2014

CINTHIA INDY TAMAYOSE

**Determinação da Atividade Antirradicalar e da
Constituição Química de Infusões de Chás**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tamayose, Cinthia Indy
T153d Determinação da atividade antirradicalar e da constituição
química de infusões de chás / Cinthia Indy Tamayose. -- São
Paulo, 2014.
71p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Baader, Josef Wilhelm

1. Quimiluminescência : Físico-química : Orgânica 2. Produtos
naturais I. T. II. Baader, Josef Wilhelm, orientador.

547.135

CDD

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Roberto e Marina, pois se não fossem por eles não teria me tornado o que sou hoje.

Aos meus irmãos, Fernando e Roberth, por sempre estarem comigo.

Ao meu namorado Luan por todo amor, carinho, dedicação, paciência e apoio, com você ao meu lado os meus dias ficam sempre mais felizes.

As minhas amigas, Carla, Sabrina, Kelly, Mariana, Juliana, Caroline e Alessandra por sempre me acompanharem nas minhas jornadas, por toda alegria e aventura compartilhada durante esses anos, por mostrarem o verdadeiro significado do companheirismo e da amizade.

Aos meus amigos do laboratório, Glalci, Panda, Sérgio, Sandro, Khalid, Made, Fernanda, Eduardo, Leonardo por todos os dias de risadas e ensinamentos.

Ao Luiz, por todos os cafés e músicas compartilhadas, e também por toda ajuda concedida nos meus dias de bancada.

A Suzana, por todos os conselhos e conversas, pelos cafés da manhã, além de toda ajuda concedida no laboratório.

Aos professores, Dr. Norberto Pepporine Lopes da USP de Ribeirão Preto e Dr. Wagner Vilegas da UNESP de São Vicente pelo uso dos equipamentos.

Aos professores, Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira e Profa. Dra. Anamaria D. P. Alexiou, pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas e por todo apoio dado desde a minha graduação.

A profa. Dra. Paulete Romoff da Universidade Presbiteriana Mackenzie pelo uso dos equipamentos, por toda ajuda na discussão dos resultados, além de todas as conversas e conselhos.

E o mais importante, ao meu orientador Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader, por todos os ensinamentos e dedicação durante esses dois anos de pesquisa. Agradeço muito por me proporcionar tamanho conhecimento, pela minha formação profissional e por todas as conversas e conselhos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Resumo

Tamayose, C. I. ***Determinação da atividade antirradicalar e da composição química de infusões de chás***. 2014. 60p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O chá obtido por infusão de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae) contém polifenóis, principalmente catequinas e flavonóis que apresentam atividade antioxidante, atuando como sequestradores de íons metálicos ou pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio. A erva-mate utilizada para o preparo da bebida chimarrão é feita a partir das folhas da árvore *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). A bebida da erva-mate é reconhecida como uma rica fonte de substâncias antioxidante, como os ácidos fenólicos que são responsáveis pelo efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo* da bebida.

Neste trabalho foi determinada a atividade antirradicalar de infusões obtidas de diferentes chás comerciais, o chá verde orgânico (CVorg) e um composto comercial de erva mate com chá verde (M+V). Os principais constituintes químicos dos chás foram identificados por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) e alguns dos constituintes foram quantificados. Dessa forma foi possível identificar em ambos os chás ao todo cinco flavonoides glicosilados, cinco ácidos clorogênicos, cinco catequinas e um alcaloide.

As infusões e algumas das substâncias identificadas foram avaliadas em relação à atividade antirradicalar utilizando diferentes métodos, um colorimétrico com os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]) e ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) e um método baseado na quimiluminescência do luminol. A infusão do CVorg mostra capacidade antirradicalar elevada quando o método com o radical ABTS^{•+} é utilizado, com valores similares aos obtidos com o padrão trolox®. Quando dois derivados catequinas foram submetidas ao mesmo ensaio com os dois radicais, observou-se que estes apresentaram uma capacidade antirradicalar maior frente ao radical ABTS^{•+}, sugerindo que a elevada atividade antirradicalar da infusão CVorg pode ser atribuída à presença das catequinas analisadas.

No método quimiluminescente a infusão do M+V apresentou uma capacidade antirradicalar mais alta que a infusão do CVorg. O ácido 5-cafeoilquinico, um derivado do ácido clorogênico, testado no mesmo ensaio, apresentou um potencial antirradicalar maior que as catequinas. Este resultado pode sugerir que a maior capacidade antirradicalar da infusão M+V comparado com a de CVorg, quando determinada com o ensaio luminol, pode ser atribuída à presença dos derivados do ácido clorogênico, tendo em vista que esta classe de compostos não foi identificada na infusão CVorg.

Palavras-Chaves: *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, atividade antirradicalar.

Abstract

Tamayose, C.I. **Determination of antiradical activity and chemical composition of tea infusions**. 2014. 69p. Master's Dissertation- Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Tea obtained by infusion of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae) contains polyphenols, especially catechins and flavonols which exhibit antioxidant activity, acting as scavengers of metal ions or by sequestering reactive oxygen and nitrogen species. The *mate* herb used for brewing the *mate* beverage 'erva-mate' is made from the leaves of the tree *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). The beverage 'erva-mate' is known as a rich source of antioxidant substances, such as phenolic acids that are responsible for the *in vitro* and *in vivo* antioxidant effect of the beverage.

In this work the antiradical activity of infusions obtained from different commercial teas, organic green tea (CVorg) and a commercial mixture of *mate* herb and green tea (M + V) was determined. The main chemical constituents of the teas were identified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and some of the constituents quantified. Thus it was possible to identify in both teas a total number of five glycosylated flavonoids, five chlorogenic acids derivatives, five catechins and one alkaloid.

The infusions and some of the identified constituents were evaluated for its antiradical activity using different methods, a colorimetric one with the stable radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) and an alternative method based on luminol chemiluminescence. The infusion of CVorg shows high antiradical capacity when evaluated by the method with the radical ABTS^{•+}, with values similar to that of the standard trolox®. When two catechins derivatives were subjected to the same test with both radical, it was observed that these showed higher antiradical capacity with the radical ABTS^{•+}, as compared to DPPH[•], suggesting that the high antiradical capacity of the CVorg infusion can be attributed to the presence of analyzed catechins.

With the chemiluminescence method the M+V infusion showed a higher antiradical capacity than the CVorg infusion. 5-Caffeoylquinic acid, a chlorogenic acid derivative, tested in this assay showed a higher antiradical capacity than catechins. This result might suggest that the higher antiradical capacity of the M+V infusion as compared to the CVorg, when measured with the luminol method, can be attributed to the presence of chlorogenic acid derivatives, since this class of compounds was not identified in the CVorg infusion.

Key-words: *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, antiradical activity.

Abreviaturas

5-CQA	Ácido 5-cafeoilquinico
ABAP	2,2'-Azo-bis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência acoplado com detecção por arranjos de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas
CVorg	Chá verde orgânico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilidrazila
EC	Epicatequina
EGCG	Galato de epigallocatequina
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
HRP	Peroxidase de raiz forte
Luminol	5-Amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona
M+V	Composto comercial de erva mate e chá verde
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (capacidade antioxidante frente a radicais de oxigênio)
QL	Quimiluminescência ou quimiluminescente
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity assay</i> (capacidade antioxidante em equivalentes de trolox)
TRAP	<i>Total radical-trapping potential</i> (Potencial antioxidante total)
Trolox®	6-Hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Radicais livres e Antioxidantes	11
1.2. Métodos para a determinação da atividade antiradicalar	14
1.3. <i>Camellia sinensis</i>	18
1.3.1 <i>Descrição da planta</i>	18
1.3.2. <i>Classificação do Chá</i>	19
1.3.3. <i>Constituição química do chá</i>	20
1.4. <i>Ilex paraguariensis</i>	24
1.4.1. <i>Descrição da planta</i>	24
1.4.2. <i>Constituição química do chá</i>	25
2. OBJETIVOS.....	26
3. METODOLOGIA	27
3.1. <i>Instrumentação</i>	27
3.2 <i>Materiais e reagentes empregados</i>	28
3.2.1 <i>Solventes e reagentes</i>	28
3.3 <i>Procedimentos experimentais</i>	28
3.3.1 <i>Obtenção das infusões</i>	28
3.3.2 <i>Determinação da concentração da infusão de chá</i>	28
3.3.3 <i>Atividade antiradicalar</i>	29
3.3.4. <i>Identificação dos constituintes químicos</i>	35
3.3.5. <i>Quantificação</i>	35
4. RESULTADOS	37
4.1. <i>Identificação de compostos presentes nas infusões</i>	37
4.2. <i>Obtenção das curvas de calibração dos chás</i>	42
4.3. <i>Capacidade antirradicar</i>	44
4.3.1 <i>Métodos colorimétricos</i>	44
4.3.1 <i>Determinação da capacidade antirradicalar utilizando-se o método quimiluminescente</i>	50
4.4. <i>Quantificação</i>	54
4.4.1. <i>Quantificação da quercetina no CVorg</i>	54
4.4.1. <i>Quantificação de alguns compostos identificados nas infusões</i>	57
5. Discussão	59
5.1. <i>Identificação dos compostos presentes nas infusões</i>	59
5.2. <i>Quantificação de compostos presentes nas infusões</i>	59

5.3. <i>Determinação da atividade antirradicalar</i>	61
5.3.1. Capacidade antirradicalar das infusões	62
5.3.2. Capacidade antirradicalar das substâncias identificadas	63
6. Conclusão.....	66
7. Referencias Bibliográficas.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Radicais livres e Antioxidantes

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados ERO (Espécies reativas de oxigênio) ou ERN (Espécies reativas de nitrogênio). O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por algumas disfunções biológicas ou provenientes dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos: os radiculares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-)¹. Frutos de origem endógena ou de alguma disfunção biológica, eles apresentam papel fundamental no metabolismo humano, na produção de energia, fagocitose entre outras etapas do funcionamento do sistema biológico. No entanto, quando em excesso causam muitos danos ao organismo como a peroxidação de lipídeos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos, agressão às enzimas e ao DNA. Dessa forma estão relacionados com várias patologias como doenças do coração, artrite, catarata, câncer e AIDS, agindo como causa ou fator agravante.

O excesso das ERO e ERN é combatido por espécies antioxidantes cuja principal função é regenerar uma espécie oxidada ou prevenir a oxidação da mesma. Espécies com essa capacidade podem ser geradas no próprio organismo como os peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), glutathione e catalase, ou absorvidos dos alimentos como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos entre os quais há de se destacar os flavonóides, pois estas espécies possuem estrutura ideal para sequestrar radicais livres, devido à estabilidade do radical flavanoil formado. A estabilidade depende, conceitualmente, da capacidade do flavonóide em deslocar o elétron desemparelhado. Para tanto, a presença de um considerável número de grupos hidroxílicos e de insaturações potencializam a atividade como agente doador de hidrogênios e elétrons¹.

Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os sintéticos e os naturais. Antioxidantes (AOH) podem ser sintetizados observando requisitos específicos, com uma baixa energia da ligação AO-H, baixo potencial de redução $AO\bullet$ / AO-H, alta constante de velocidade da reação de abstração de hidrogênio, baixa energia de ativação desta reação e alta estabilidade do intermediário.² No entanto, estudos realizados com antioxidantes sintéticos como o butilidroxianisol (BHA), o butilidroxitolueno (BHT), o propil galato (PG) e a terc-butilidroquinona (TBHQ) demonstram que estes derivados podem apresentar efeitos adversos e nocivos à saúde em animais (Figura 1).³ Dessa forma, nos últimos anos tem havido a preocupação de se obter substâncias naturais que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos, podendo ainda apresentar vantagens na funcionalidade, sobretudo na área de saúde.⁴

Figura 1: Estruturas de alguns antioxidantes sintéticos.

Antioxidantes naturais, com possibilidade de utilização comercial, geralmente compostos fenólicos de fontes vegetais, podem ser divididos em dois grandes grupos; os flavonoides e os não flavonoides, ambos, metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais.

Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular, que compartilham um esqueleto comum de difenilpirano C₆-C₃-C₆. O esqueleto é composto por dois anéis aromáticos (A e B), ligado através de um anel pirano C.

A distribuição dos flavonoides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo como a classe do vegetal, bem como da variação das espécies. Os flavonoides são formados da combinação de derivados da fenilalanina (sintetizados pela via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios UVB, que

catalisam a formação dos flavonoides. Consequentemente, em espécies cultivadas em sistemas que bloqueiam os raios UVB, o conteúdo de flavonoides é reduzido.^{5,6}

Evidências experimentais sugerem que os flavonoides são capazes de proteger o corpo humano contra os danos causados por agentes oxidantes (raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos). Dado que não podem ser sintetizados pelo nosso organismo, sendo representativos da parte não energética da dieta humana, são adquiridos pela ingestão de alimentos que os contenham ou através de suplementos nutritivos. Alimentos que são fontes de flavonoides incluem frutas, verduras, cerveja, vinho, chá verde, chá preto e soja.

Os flavonoides são divididos em subclasses: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ol e antocianidinas (Figura 2).

Figura 2: Exemplos das principais subclasses dos flavonoides

Três características na estrutura química dos flavonoides são as responsáveis pela atividade de neutralização de radicais: a presença de grupos hidroxílicos no anel B, o que confere maior estabilidade a forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos elétrons; a presença de uma ligação dupla em C2-C3, aumentando a deslocalização eletrônica a partir do anel B, e a presença de grupos hidroxílicos nas posições 3 e 5 com a função oxo, promovendo a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para esses dois substituintes.⁷

A quercetina é um flavonoide amplamente estudado devido a sua presença em vários alimentos, e seu comportamento como antirradical é favorecido devido à

presença de cinco grupos hidroxílicos. A quercetina apresenta alta velocidade de reação com radicais livres *in vitro* porque a abstração de um átomo de hidrogênio leva a um radical estável devido a sua estrutura conjugada aromática (Figura 3).⁸

Figura 3: Estrutura química da quercetina.

Os compostos fenólicos não flavonóidicos podem ser responsáveis também pela prevenção de doenças degenerativas. Neste sentido, as frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares, especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico nas quais estão frequentemente presentes. Muitos destes compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora.⁹

Os antioxidantes naturais denominados de não flavonoides são classificados como (Figura 4):⁹

- os derivados das estruturas químicas C_6-C_1 específicas dos ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico;
- os derivados das estruturas químicas C_6-C_3 específicas dos ácidos cafêico e *p*-cumárico e hidroxicinamatos;
- os derivados das estruturas químicas $C_6-C_2-C_6$ específicas do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídeo.

Figura 4: Estruturas de alguns antioxidantes naturais não flavonoides.

1.2. Métodos para a determinação da atividade antiradicalar

Halliwell e Gutteridge avaliaram vários métodos para a determinação da capacidade antioxidante total de substâncias puras e misturas, definindo que um antioxidante é uma substância ou mistura que, em baixa concentração, reduz ou previne a oxidação de um substrato oxidável.¹⁰ Além disso, foi destacada a importância de se conhecer a fonte de estresse oxidativo e o mecanismo de ação e o

alvo do ataque dos radicais livres.¹¹ Neste sentido, uma variedade de procedimentos químicos, físicos e bioquímicos tem sido desenvolvida na investigação e caracterização de antirradicais naturais ou sintéticos com potencial antioxidante, com a finalidade de estabelecer resultados reprodutíveis e comparáveis. Existe na literatura, uma série de abordagens descritas incluindo vários artigos de revisão.^{12, 13, 14}

O método de Folin-Ciocalteu tem sido utilizado há muitos anos para medir o conteúdo total de fenóis em extratos de espécies vegetais, os quais contém compostos polifenólicos. Desenvolvido em 1927,¹⁵ esse método é baseado na reação de fenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) que contém uma mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio com o molibdênio no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, quantificados por espectrofotometria no visível permitindo a determinação da concentração de compostos fenólicos. Uma desvantagem do método é que muitas substâncias podem interferir na análise, entre elas a vitamina C, açúcares e aminas aromáticas.¹⁶

O método ORAC (*“oxygen radical absorbance capacity”*, ou capacidade antioxidante frente a radicais de oxigênio) é um ensaio desenvolvido por Cao *et al*,¹⁷ e envolve a iniciação da peroxidação lipídica através da produção de radicais peroxila hidrossolúveis a uma velocidade constante pela decomposição térmica do hidrocloreto de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropila) (ABAP). O princípio do ensaio baseia-se na reação dos radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) com um composto fluorescente, normalmente fluoresceína ou diclorofluoresceína, formando produtos não fluorescentes. A medida antirradicalar é obtida pela variação da intensidade da fluorescência integrada a partir da adição de um composto antirradical até seu consumo total. O valor de ORAC é expresso em equivalente do ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico (trolox®) (Figura 5), um antioxidante desenvolvido para preservação de alimentos que apresenta alto potencial antioxidante, com estrutura cromano similar ao α -tocoferol, porém sem a cadeia lateral hidrofóbica. Este ensaio pode ser usado com outras fontes de radicais e solventes, onde há flexibilidade para testar substâncias hidrofílicas e lipofílicas.¹⁸

Figura 5: Estruturas do trolox®.

O método TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity assay*, ou capacidade antioxidante em equivalentes de trolox) baseia-se na redução do cátion radical 2,2'-azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}) na presença de um antioxidante (Figura 6). O cátion radical é obtido pela oxidação de ABTS com persulfato de potássio ou dióxido de manganês. A capacidade antioxidante é definida pela porcentagem de inibição da formação de ABTS^{•+}, monitorada espectrofotometricamente com absorbância máxima em 415, 645, 734 e 815 nm, utilizando-se o trolox® como antirradical padrão.¹⁹

Figura 6: Estruturas de ressonância do radical ABTS^{•+}.

O radical estável orgânico 2,2'-difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]) (Figura 7), de cor púrpura, também é utilizado para a avaliação da capacidade antirradicalar; o método consiste basicamente na habilidade de um antirradical em reduzir a espécie DPPH[•], observada pela alteração da absorbância inicial da solução. O radical DPPH[•] é disponível comercialmente, e não precisa ser gerado como o ABTS^{•+}. A solução desse radical apresenta coloração púrpura, observada em uma banda de absorção característica com máximo em 515 nm. Esse método, proposto inicialmente por Blois em 1958,²⁰ está baseado na descoloração da solução de DPPH[•] para amarela pálida pela redução do radical, extinguindo a banda de absorção característica em 515 nm.

Figura 7: Estrutura do radical DPPH[•].

A reação entre o radical DPPH[•] e um composto antirradical pode ser monitorado espectrofotometricamente pela variação da absorbância do sistema em 515 nm. A capacidade antirradicalar do aditivo é comumente expressa com o parâmetro EC₅₀, que corresponde à concentração da amostra que leva a uma redução da concentração de DPPH[•] a 50% da inicial. Entretanto, esta maneira de expressar o resultado depende, obviamente, da concentração inicial do DPPH[•] utilizada e deve, por isso, ser interpretado com o devido cuidado.²¹ A principal desvantagem do método DPPH[•] é que a sua reatividade difere fortemente da reatividade dos radicais com

importância biológica, que normalmente mostram alta reatividade, como os radicais peroxila. Compostos antirradicais que reagem rapidamente com radicais reativos como o peroxila podem mostrar baixa reatividade ou não reagir com o radical estável DPPH[•] devido ao seu impedimento estérico.¹⁶

O método TRAP (*total peroxyl radical-trapping potential*) foi desenvolvido por Wayner *et al*²² para determinar o potencial antioxidante total de amostras de plasma. Esse procedimento é baseado em medidas de tempo de indução em um sistema de oxidação de lipídeos, onde radicais livres são produzidos a uma taxa constante com o emprego de ABAP como fonte de radicais livres.

O consumo de oxigênio é utilizado para monitorar a velocidade do processo, o trolox® também é utilizado como antioxidante de referencia nesse caso.²³ Os efeitos de diferentes tratamentos médicos sobre a capacidade antioxidante do plasma em diferentes condições de saúde pode ser avaliada por esse método, quando então o resultado é expresso em relação a um valor de referência.²⁴

A oxidação quimiluminescente (QL) do luminol tem sido amplamente estudada desde que foi reportada pela primeira vez por Albrecht em 1928.²⁵ Desde então é utilizada uma grande variedade de oxidantes e catalisadores nos sistemas QL propostos, dessa forma sendo aplicado na determinação de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Os catalisadores comumente considerados mais eficientes, tendo como oxidante o peróxido de hidrogênio, são as peroxidases, em particular a peroxidase de raiz forte (HRP – *horseradish peroxidase*), extraída de raiz forte. Essa reação é utilizada como base de muitos bioensaios e imunoensaios, sendo capaz de quantificar peroxidase, ligada a qualquer entidade (proteínas, peptídeos e outras biomoléculas). Ainda é capaz de quantificar peróxido de hidrogênio assim que é produzido por uma reação específica, como pela oxidação de glicose catalisada pela glicose oxidase.²⁶ A aplicação da quimiluminescência do luminol também pode ser aplicada na determinação de metais de transição, uma vez que esses cátions apresentam efeitos catalíticos ou inibidores (caso de alguma mistura de espécies) na reação de oxidação do luminol.²⁷ É possível também com essa reação a determinação do potencial uma vez que há supressão da emissão devido ao consumo dos radicais envolvidos na reação.²⁸

Apesar da intensa aplicação analítica, o mecanismo da oxidação do luminol não está totalmente estabelecido. Sabe-se que apenas quando o luminol é oxidado sob condições alcalinas é que se observa emissão QL eficiente, e sob qualquer condição, 3-aminofalato e nitrogênio molecular são os produtos principais da reação.²⁹

Uma adaptação do ensaio TRAP original proposta por Lissi *et al*,³⁰ baseia-se na supressão da luz emitida em uma reação quimiluminescente pelo consumo de radicais envolvidos nessa reação. O método TRAP quimiluminescente é baseado na oxidação do luminol usando ABAP como fonte de radicais livres. A reação entre antirradicais e os radicais presentes inibem a quimiluminescência do sistema por um tempo diretamente proporcional à concentração total de aditivo (tempo de indução), e a capacidade antioxidante é medida em relação ao antioxidante padrão, trolox®.³¹

O método da quimiluminescência proveniente da oxidação do luminol mede a capacidade antirradicalar, através da inibição da quimiluminescência com a presença de um antirradical; a supressão da luz é proporcional à concentração do antirradical. Foi desenvolvido e estudado um método quimiluminescente pelo nosso grupo de pesquisa, a partir do sistema do luminol/hemina/H₂O₂, que apresenta uma emissão constante de decaimento compatível com o sistema luminol/ABAP tendo, no entanto, uma intensidade de emissão mais elevada.² A emissão pode ser suprimida por substâncias que apresentem atividade antirradicalar, sendo que a área de supressão apresenta boa correlação com a concentração da amostra; diante disso foi proposto um método TRAP expresso em mg.L⁻¹ de antirradical correspondente a área de supressão equivalente ao trolox® na concentração de 1 µmol.L⁻¹. Esse método, que atualmente está bem estabelecido, é usado na avaliação da capacidade antirradicalar de flavonoides, extratos de produtos naturais e diversos derivados fenólicos.^{28, 32} Uma das limitações do ensaio é o fato de ser realizado em meio aquoso e pH alcalino (11,6), onde alguns flavonoides não são solúveis.

1.3. *Camellia sinensis*

1.3.1 *Descrição da planta*

A planta *Camellia sinensis* pertence à família Theaceae, e cresce na zona de vegetação de florestas laurissilvas que começa ao sul do Himalaia, próximo ao centro do Sudeste Asiático, passa pelo sudoeste da China e se estende até o Japão. Atualmente é cultivada principalmente na China, Índia, Brasil e África. Na Europa, o único país que produz chá é Portugal. No Brasil, seu cultivo é mais restrito ao Vale do Ribeira no Estado de São Paulo, por apresentar condições climáticas mais favoráveis, e a maior parte é destinada para a produção do chá preto.³³

O chá obtido por infusão de *Camellia sinensis* é a segunda bebida mais consumida do mundo, ficando atrás somente da água. Apesar de que essa espécie vegetal ser cultivada em várias regiões do mundo, especialmente nos países asiáticos, ela cresce bem em regiões tropicais e subtropicais, com solo levemente ácido.³⁴

Enquanto nos países orientais o chá mais consumido é o verde, no Ocidente o mais consumido é o chá preto, embora o consumo do chá verde venha crescendo, devido principalmente à divulgação de suas propriedades funcionais. Diversos estudos têm mostrado os benefícios do consumo de chá verde, incluindo redução dos níveis de colesterol, atividades imunoestimulatória, antimicrobiana e antioxidante, auxiliando na prevenção de doenças crônico-degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares.³³

Camellia sinensis é uma planta que tem folhagem durante o ano todo, e assim como outras árvores, passa o inverno sem desenvolvimento e no início da primavera, com a elevação da temperatura, começa a lançar brotos. Esses brotos e folhas são colhidos para a produção de chá.

No Brasil, a colheita do chá inicia-se em setembro e prossegue durante 8 meses até o mês de abril. Como o clima no Brasil é mais ameno que do Japão, o desenvolvimento dos brotos requer menor tempo, podendo ser colhidos com espaçamento de 2 semanas, o que possibilita cerca de 12 colheitas ao ano. Sem que a planta seja podada, pode atingir até 10 m de altura, e cultivada possui cerca de 1 a 2 m. As folhas são perenes, de coloração verde escuro e possuem uma fina cobertura branca e sedosa, semelhante a uma penugem que, mais tarde, desaparece. As suas flores são brancas, aromáticas, têm geralmente 4 ou 5 pétalas e surgem nas axilas das folhas em grupos de 2, 3 ou 4. O fruto é uma cápsula com 2 ou 3 cm de diâmetro (Figura 8).

Figura 8: Folha, flor e frutos de *Camellia sinensis*

1.3.2. Classificação do Chá

Dependendo do processo ao qual as folhas são submetidas e ao seu local de crescimento, o chá pode ser classificado em três principais tipos.³⁵

- Fermentado: Chá Preto – Inicialmente, as folhas da *Camellia sinensis* não são cozidas a vapor, como ocorre no processo do chá verde. Primeiramente, as folhas são

deixadas em uma sala, distribuídas em prateleiras, pelo período de um dia, com o objetivo de reduzir a umidade das folhas. No final deste período, as folhas estão macias o suficiente para serem enroladas no formato de pequenas bolas. Com o rompimento da estrutura celular das folhas, há a liberação de enzimas que irão fermentá-las. As folhas enroladas são espalhadas em prateleiras para que a fermentação ocorra, por aproximadamente 6 horas. Após este período, as folhas são colocadas em câmaras de ar quente, para secar e bloquear a fermentação por meio da desnaturação das enzimas. Durante este processo, as folhas tornam-se escuras, perdem cerca de 2% da umidade e é obtido o sabor característico do chá preto.

- Semi – Fermentado: Chá Oolong – É parcialmente fermentado, caracterizando o seu sabor diferenciado dos outros tipos de chá. As folhas são processadas seguindo o mesmo procedimento da produção do chá preto. A única diferença está no menor tempo de fermentação, aproximadamente 2 horas.
- Não – Fermentado: Chá Verde – Durante a produção, as folhas da *Camellia sinensis* são picadas e submetidas a um cozimento a vapor, tornando-as mais flexíveis e maleáveis, com o objetivo de facilitar o manuseio para as próximas etapas de produção. As folhas são enroladas e colocadas em bandejas aquecidas, visando romper a estrutura celular, e assim, obter o sabor desejado do chá. Em seguida, as folhas são secas até que retenham apenas 2% de sua umidade original.

Além dos três tipos citados, temos também o Chá Branco, que é o menos processado dos chás. É produzido a partir dos botões prateados e de folhas selecionadas de *Camellia sinensis*, que são apenas lavados e secos. Por ter um processamento mínimo, o chá branco contém mais compostos fenólicos que os outros tipos de chá, proporcionando mais efeitos benéficos a saúde. O chá vermelho possui fermentação completa, e por longo tempo. O processo completo de produção do chá vermelho exige, no mínimo, três anos. É durante este longo período que a bebida adquire a cor característica.³⁵

1.3.3. Constituição química do chá

Estudos têm demonstrado que o chá brasileiro apresenta maior quantidade de compostos fenólicos quando comparado com chás de outros países e tal fato é atribuído às características do clima e do solo. Embora algumas características do chá verde produzido no Brasil já tenham sido avaliadas, especialmente quanto aos teores das catequinas presentes, os estudos do chá verde brasileiro (*var. assamica*) ainda são escassos quando comparados aos realizados com chás verdes produzidos em outros países.^{33, 36, 37}

Muitos fatores podem influenciar significativamente a composição química do chá, como a variedade botânica, a estação do ano na qual as folhas foram colhidas, idade das folhas, além de clima e técnicas de cultivo.³⁸

As folhas não fermentadas possuem de 15-25% de proteínas, 5% de glicídios, 30% de polifenóis, 1-5% de alcaloides, vitaminas (C, B1, B2 e K), além de minerais como flúor, potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês e fósforo.³⁸ Dentre os alcaloides, a cafeína corresponde a 2,9-4,2%, a teofilina a 0,02-0,04% e a teobromina a 0,15-0,2% (Figura 9).

Figura 9: Estruturas da cafeína, teofilina e teobromina.

Todos os chás são ricos em compostos fenólicos que também estão presentes no vinho tinto, em frutas e vegetais. Os principais constituintes fenólicos presentes nos chás são catequinas e flavonóis, sendo potentes antioxidantes e inibidores da lipoperoxidação, protegendo componentes proteicos e DNA celular.³⁹ Os principais flavonoides presentes no chá verde são os monômeros de catequinas (Figura 10). As catequinas do chá verde incluem a catequina (C), a galocatequina (GC), a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG). A EGCG corresponde a mais abundante catequina do chá verde (50-60%).⁴⁰

Figura 10: Estruturas das catequinas presentes no chá verde

A cor, o sabor e o aroma do chá verde estão direta ou indiretamente associados às catequinas⁴¹; portanto, são os principais compostos que definem a qualidade do chá verde. O sabor adstringente e amargo do chá verde é devido principalmente a esses polifenóis.⁴²

Tais substâncias estão presentes em baixas quantidades no chá preto, sendo substituídas por teaflavinas e tearubiginas (Figura 11). Tearubiginas são polímeros constituídos por unidades de catequina de estrutura desconhecida.

Figura 11: Estruturas de teaflavinas

Dentre os flavonóis, os constituintes mais comuns são os glicosídeos de quercetina e de kaempferol, e menor proporção de miricetina (Figura 12). Os açúcares ligados aos esqueletos flavonoídicos podem ser mono, di ou triglicosídeos.

Figura 12: Estruturas da quercetina, kaempferol e miricetina

Outras substâncias fenólicas presentes no chá são ácido gálico, além de ésteres quínicos dos ácidos gálico, cafeico e *p*-cumárico (Figura 13).

Os constituintes polifenólicos presentes no chá apresentam atividade antioxidante, atuando como sequestradores de íons metálicos ou pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio.⁴³ Bastos e colaboradores verificaram que os extratos em etanol e o aquoso de amostras de erva mate e de chá verde apresentaram uma excelente atividade antirradicalar frente ao DPPH' (>89%).⁴⁴ Estudos epidemiológicos e com animais indicam que o chá verde pode conferir

proteção contra vários tipos de câncer, além de ser hipocolesterolêmica, atuar na prevenção de arteriosclerose, diminuir a resistência a insulina e outros.⁴²

Figura 13: Estruturas dos ácidos presentes no chá

Diferentes sistemas de solventes são usados para a extração das substâncias polifenólicas de materiais vegetais. A água, soluções hidroalcoólicas de metanol ou de etanol, assim como acetona tem sido utilizados como agentes extratores. Na maioria dos trabalhos envolvendo chás, os pesquisadores utilizam a água em ebulição para a extração dos constituintes polifenólicos. Turkmen e colaboradores avaliaram a utilização de água e de diferentes solventes orgânicos para a extração de constituintes polifenólicos do chá preto e da erva mate.⁴² A eficiência da extração foi baseada na quantificação dos polifenólicos extraídos, utilizando-se os ensaios com tartarato ferroso e Folin-Ciocalteu. Os autores concluíram que, o extrato em DMSO 50% obtido a partir do chá preto apresentou a maior proporção de polifenólicos, e o melhor sistema de extração para a erva mate foi a acetona 50%. Dessa forma, solventes com diferentes polaridades tem um efeito significativo no teor de constituintes polifenólicos extraídos e, conseqüentemente, na atividade antirradicalar.

Pan e colaboradores utilizaram quatro sistemas de solventes e quatro procedimentos de extração de constituintes químicos do chá.⁴⁵ Os autores concluíram que a extração assistida por micro-ondas seguida de ultra-som levou a extração dos maiores teores de polifenóis e de cafeína. Perva-Uzunalic e colaboradores investigaram as temperaturas e os períodos de extração, e obtiveram a maior eficiência de extração a 80 °C por um período de 20-30 minutos.⁴⁶

As técnicas mais utilizadas para a separação, identificação e quantificação dos constituintes polifenólicos são a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fase reversa com detecção UV, e a Eletroforese capilar. Del Rio e colaboradores desenvolveram um método baseado em CLAE-EMⁿ para a análise dos constituintes de

infusões do chá verde e do preto.⁴² Os autores utilizaram dois gradientes diferentes de fase móvel, visando caracterizar os derivados de catequina com um dos sistemas, e os flavonoides e teaflavinas no outro. Os compostos foram identificados com base nos tempos de retenção, nos espectros de absorção e nos padrões de fragmentação, sendo possível a identificação de mais de trinta constituintes químicos.

1.4. *Ilex paraguariensis*

1.4.1. Descrição da planta

Ilex paraguariensis pertence à família Aquifoliaceae, é uma árvore nativa da América do Sul usada para a produção de erva-mate. É encontrada principalmente em regiões meridionais da América do Sul como na Argentina (Corrientes e Misiones), Paraguai (Alto Parana, Amambay, Caaguazu, Central, Guaira, Itapua, Misiones, San Pedro), Uruguai⁴⁷ e no Brasil é distribuído na região nordeste (Bahia), centro-oeste (Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina)⁴⁸.

A árvore de erva-mate é típica de sub-bosque, pertence a um agrupamento vegetal típico da floresta araucária. A altura é variável podendo chegar a 15 metros, com troncos acinzentados com diâmetro geralmente de 20 a 25 centímetros, podendo chegar aos 50 centímetros. Suas folhas encontram-se de forma alternada nos ramos, medindo de oito a dez centímetros de comprimento por quatro a cinco centímetros de largura. Em relação ao comportamento das flores, a erva-mate é uma planta dióica tendo a floração com ocorrência de setembro a dezembro, predominantemente em outubro e, o amadurecimento dos frutos se dá no primeiro trimestre de cada ano. O fruto mede de 6 a 8 centímetros, é de cor verde quando novo, passando a vermelho arroxeado em sua maturidade (Figura 14).⁴⁹

Figura 14: Folha, flor e frutos de *Ilex paraguariensis*.

1.4.2. Constituição química do chá

Em infusões de erva-mate é possível detectar a presença de xatinas, uma classe de alcaloides, como a teobromina, a teofilina e a cafeína como o majoritário entre os três, cafeoil derivados, como o ácido cafeico, ácidos clorogênicos, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5- dicafeoilquínico. Devido à alta concentração desses derivados, além da presença de flavonoides, como a rutina, quercetina e kaempferol, erva-mate possui uma alta atividade antirradicalar.⁴⁶ As estruturas dessas substâncias estão representadas na figura 15.

Além da atividade antirradicalar a erva-mate mostrou ser estimulante do sistema nervoso, hipocolesterolêmico, diurético, benéfico ao sistema cardiovascular, e tem sido sugerida para o tratamento da obesidade.⁴⁶

Figura 15: Estruturas de constituintes químicos da erva-mate.

2. OBJETIVOS

- Determinar a capacidade antirradicalar de infusões de chás de procedências diversas, utilizando-se diferentes métodos.
- Avaliar a capacidade antirradicalar dos compostos contidos nas infusões utilizando-se métodos diferentes, nos quais são utilizados radicais com diferentes reatividades.
- Determinar parcialmente a constituição química de diferentes infusões de chá, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência.
- Correlacionar a capacidade e reatividade antirradicalar das infusões de chás com a sua constituição química.
- Identificar os principais compostos químicos responsáveis pela atividade antirradicalar, e eventualmente, antioxidante de diferentes chás.

3. METODOLOGIA

3.1. Instrumentação

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um Cromatógrafo Dionex P680A equipado com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos, modelo UVD 340U e módulo de tratamento de dados CHROMELEON. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Ascentis® RP-Amide (4,6 x 250 mm) e 5,0 µm de diâmetro de partícula, com pré-coluna Ascentis™ RP-Amide (4,0 x 20 mm), com partículas de 5 µm, injetor manual Rheodyne 8125 com loop de 20 µL e um fluxo de 1,0 mL/min.

As eluições foram realizadas através de dois gradientes, seguindo procedimento descrito por Del Rio e colaboradores.⁴⁰ Para catequinas e hidrocina-matos foi iniciado com uma mistura de 96% de H₂O acidificada com 2% de ácido acético (AcOH) e 4% de acetonitrila, e finalizado com 75% H₂O acidificada com 2% de AcOH e 25% de acetonitrila em 65 minutos acompanhado em 270nm. Já para flavonoides e teaflavinas foi iniciado com uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 2% de AcOH e 4% de ACN, e finalizado com 70% H₂O acidificada com 2% de AcOH e 30% de ACN em 65 minutos acompanhado em 365nm.⁴⁰ A eluição para a quantificação da quercetina foi iniciada com uma rampa de 80% de H₂O acidificada com 2% de AcOH e 20% de ACN até 60% de H₂O acidificada com 2% de AcOH e 40% de ACN em 10 minutos, em seguida outra rampa até 100% de ACN até 25 minutos, mantendo 100% de ACN até 35 minutos.

As análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-DAD-EM) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em um CLAE da Shimadzu, constituído por bomba LC-10AD vp, controladora SLC-10A vp, detector UV-Vis SPD-M10A vp, injetor automático SIL-10AF e módulo de tratamento de dados LCsolution versão 1.24 – Shimadzu. O espectrômetro de massas utilizado foi o Bruker, modelo Esquire plus 3000, com analisador de íon trap, fonte de íons por elétron-spray e módulo de tratamento de dados Esquire control versão 5.2.

A cinética das reações quimiluminescentes foram acompanhadas utilizando-se um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse com a tensão da fotomultiplicadora de 800 V, fenda de 20 nm e grade na posição de espelho (nesta condição, não há separação espectral da luz incidente e todos os comprimentos de onda de emissão são registrados pela fotomultiplicadora). Os espectros de absorção e as cinéticas do

ensaio com DPPH[•] e cátion radical ABTS^{•+} foram obtidas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Probe, com *cell holder* com espaço para 18 cubetas.

3.2 Materiais e reagentes empregados

3.2.1 Solventes e reagentes

Para os ensaios cinéticos foram utilizados o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Sigma Aldrich), o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) (Sigma Aldrich), o persulfato de potássio (Merck), luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona, Sigma, 97%); hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX, Sigma); peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil, 60% m/m) Trolox® (6-Hidróxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (Sigma Aldrich), etanol (Synth) previamente tratado e água Milli-Q também utilizada para a realização das infusões. Para as análises em CLAE foram usados solventes grau HPLC, das marcas J. T. Baker e Vetec. Para as quantificações foram utilizados os padrões, ácido clorídrico (Synth), a quercetina, a epicatequina e o galato de epigallocatequina utilizados são da marca Sigma Aldrich. Para identificação foram utilizados os padrões, (+)-catequina, (+)-galocatequina e galato de epicatequina todos da marca Sigma Aldrich.

Os chás utilizados nas infusões são amostras comerciais de *Camellia sinensis* com o selo de produto orgânico da marca Yamamotoyama e um composto comercial de *Ilhex paraguayensis* e *Camellia sisnensis* da marca Madrugada, ambos produzidos no Brasil.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Obtenção das infusões

As infusões do chá verde orgânico e do composto comercial de erva mate com chá verde foram preparadas no mesmo dia do experimento a partir da adição de 9,0 mL de água destilada fervendo a aproximadamente 500 mg da amostra, e as soluções foram filtradas após 3 minutos.⁴⁰

3.3.2 Determinação da concentração da infusão de chá

Para determinar a concentração de material não volátil das infusões foi feita uma curva de calibração com soluções contendo quantidades conhecidas do reagente liofilizado. Para isso as infusões foram liofilizadas e a partir do liofilizado foram preparados soluções estoques de 10,0 mg em 10,0 mL de água. A partir dessas soluções foi obtido o espectro de absorção das amostras de chá verde orgânico (CVorg) (Figura 16a) e do composto comercial de erva-mate com chá verde (M+V)

(Figura 16b), em que foi possível notar que a banda de absorção máxima do CVorg é em 272 nm e do M+V em 324 nm.

Figura 16: a) Espectro de absorção da infusão do chá verde orgânico; b) espectro de absorção da infusão do composto comercial de erva mate e chá verde.

Obtidos os espectros de absorção de soluções com concentrações conhecidas de liofilizado dos chás foi possível montar uma curva de calibração de absorbância no comprimento de onda máximo em função da concentração das infusões liofilizadas. Assim foram preparadas cinco concentrações de 33,3 mg L⁻¹ a 100,0 mg L⁻¹ a partir da solução estoque de CVorg e 16,7 mg L⁻¹ a 50,0 mg L⁻¹ a partir da solução estoque de M+V. As análises foram feitas em triplicata.

As relações em massa encontradas entre o chá seco e as folhas utilizadas para a infusão foram de 0,198 g de chá seco/ g de folhas para o CVorg e de 0,247 g de chá seco/ g de folhas para o M+V.

3.3.3 Atividade antirradicalar

3.3.3.1 Métodos colorimétricos

A solução de DPPH[•] foi preparada a partir de 6,3 a 7,0 mg de DPPH[•] em 10 mL de etanol, com concentração de aproximadamente 1,5 mmol L⁻¹. A preparação do radical ABTS^{•+} é feita a partir da oxidação do ABTS com persulfato de potássio, desse modo foi preparada uma solução de ABTS a partir de 192,0 mg de ABTS sólido em 50,0 mL de água Milli-Q, com concentração de aproximadamente 7,5 mmol L⁻¹, e uma solução 378,42 mg de persulfato de potássio em 10,0 mL de água Milli-Q. Uma alíquota de 5,0 mL da solução de ABTS é reagida com 88,0 µL da solução de persulfato de potássio e deixada em repouso e ao abrigo da luz por 16 horas. A concentração final da solução do radical ABTS^{•+} obtida por este procedimento é aproximadamente de 4,0 mmol L⁻¹. As concentrações exatas das soluções de DPPH[•] e ABTS^{•+} foram determinadas pelas absorbâncias máximas em 515 nm do DPPH[•] (Figura 17a) considerando o $\epsilon_{\text{DPPH}} = 1,09 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e 734 nm do ABTS^{•+} (Figura

17b) considerando o $\epsilon_{\text{ABTS}^{++}} = 1,50 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A solução do antirradical trolox® foi preparada com 5,0 mg em 25,0 mL etanol. Para as análises as infusões foram diluídas 10 vezes e com o radical ABTS^{++} diluídos 20 vezes. A solução do padrão ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA) foi preparada com 2,0 mg em 10,0 mL de etanol, a de galato de epigallocatequina (EGCG) foi preparada 2,3 mg em 10,0 mL de etanol e a de epicatequina (EC) foi preparada com 1,5 mg em 10,0 mL de etanol. As soluções preparadas permaneceram no sonificador o tempo necessário até total solubilização.

Figura 17: a) Espectro de absorção do $\text{DPPH}^\bullet$ ($60,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol) e; b) Espectro de absorção do ABTS^{++} ($62,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água Milli-Q).

As análises foram realizadas em cubetas de quartzo para absorbância com caminho óptico de 10 mm, com volume total de 3,0 mL. As quantidades exatas das soluções estoque de $\text{DPPH}^\bullet$ e ABTS^{++} utilizadas dependem das concentrações destas soluções; a concentração final de $\text{DPPH}^\bullet$ foi ajustada para $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a de ABTS^{++} para $5,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em um volume final de 3,0 mL. As medidas foram iniciadas pela adição da solução do antirradical. As concentrações de trolox® utilizadas nas cinéticas com o radical $\text{DPPH}^\bullet$ foram de 2,5 a $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ e de 1,25 a $3,75 \text{ mg L}^{-1}$ nos ensaios com o radical ABTS^{++} . As quantidades das soluções das infusões utilizadas nas cinéticas com o radical $\text{DPPH}^\bullet$ foram de 10 a 50 μL de ambos chás, nos ensaios com o radical ABTS^{++} os volumes utilizados foram de 5 a 25 μL de CVorg e de 10 a 70 μL de M+V. As concentrações de 5-CQA utilizadas nas cinéticas com ambos radicais foram 1,77 a $8,86 \text{ mg L}^{-1}$, as concentrações de EGCG foram de 1,14 a $5,73 \text{ mg L}^{-1}$ para a cinética o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e 0,46 a $2,29 \text{ mg L}^{-1}$ para a cinética com o radical ABTS^{++} e as concentrações de EC 1,45 a $7,30 \text{ mg L}^{-1}$ para as cinéticas com o radical $\text{DPPH}^\bullet$ e 0,58 a $2,90 \text{ mg L}^{-1}$ para as cinéticas com o radical ABTS^{++} . A cinética da reação foi observada pela variação da absorbância da solução de $\text{DPPH}^\bullet$ em 515 nm e de ABTS^{++} em 734 nm durante 40 minutos.

Todos os ensaios cinéticos foram realizados em triplicata em medidas independentes e os resultados tratados e representados com média e desvio padrão no programa Origin Pro 8.5, onde as curvas cinéticas foram reproduzidas. A variação da absorbância ($\Delta\text{Abs.}$) entre $T_{0\text{min}}$ e $T_{40\text{min}}$ ($\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}$) mostra uma correlação linear com a concentração do antirradical.

Para o cálculo da atividade antirradicalar da infusão foram utilizados os coeficientes angulares das correlações das concentrações do antirradical e do padrão Trolox® em função da variação da absorbância. Desta maneira obtém-se o valor correspondente da atividade antirradicalar em porcentagem de trolox® (%T), conforme a equação 1.²¹

$$\%T = (\alpha A / \alpha T) \cdot 100\% \text{ (equação 1)}$$

3.3.3.2 Método quimiluminescente

- Soluções

- Luminol:

A solução estoque de luminol ($\sim 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foi preparada a partir de 18,0 mg de luminol em 10 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, e sua concentração exata foi determinada espectrofotometricamente em 347nm ($\epsilon = 7600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) (Figura 18).

Figura 18: Espectro de absorção do luminol ($1,03 \cdot 10^{-4} \text{ mmol L}^{-1}$) registrado em NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$

- Hemina:

A solução estoque de hemina ($\sim 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$) foi preparada a partir de 2,6 mg de hemina em 5,0 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, e sua concentração exata foi determinada

espectrofotometricamente em 385 nm ($\epsilon = 58\,400\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (Figura 19). Para a realização dos ensaios a solução de hemina foi diluída 100 vezes imediatamente antes do início dos experimentos obtendo-se uma solução de trabalho de aproximadamente $6,7\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 19: Espectro de absorção do hemina ($5,3\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) registrado em NaOH $1,0\text{ mol L}^{-1}$

.- Peróxido de hidrogênio:

A solução estoque de peróxido de hidrogênio (cerca de $1,0\text{ mol L}^{-1}$) foi preparada a partir de uma solução 60% (m/m), diluindo-se 1,0 mL dessa solução em 20 mL de água. A concentração exata foi determinada espectrometricamente em cubeta de quartzo para absorção, pela adição de 2988 μL de uma solução de iodeto de potássio $0,05\text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 3,8; $0,1\text{ mol L}^{-1}$), 6 μL de uma solução de peroxidase HRP VI (Sigma, 1 mg mL^{-1}) em água e 6 μL da solução estoque de peróxido de hidrogênio diluída 100 vezes (Figura 20). Nesse método, a quantidade de iodeto oxidado é proporcional à concentração de peróxido, cuja concentração se obtém diretamente pela absorbância em 353 nm ($\epsilon = 25.500\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) da espécie I_2 formada (Equação 2). Para a realização dos ensaios a solução estoque de H_2O_2 inicialmente preparada foi diluída 1000 vezes antes do início do experimento para obter uma solução de trabalho de aproximadamente $1,0\text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 20: Espectro de absorção obtido da reação de peróxido de hidrogênio ($0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em meio aquoso (em tampão acetato com iodeto de potássio, pH 3,8; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), catalisada por HRP.

- Procedimento do ensaio antirradicalar com luminol:

Em cubeta de quartzo para fluorescência munida de agitação magnética, foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de solução de luminol ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e $20 \mu\text{L}$ da solução de hemina ($6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) a $1,92 \text{ mL}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 11,6. A reação quimiluminescente é iniciada pela adição de $20 \mu\text{L}$ da solução de peróxido de hidrogênio ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) aos outros componentes. Após cem segundos de reação, adicionam-se $20 \mu\text{L}$ da solução da amostra antirradical em diferentes concentrações ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ no caso do trolox®, $50,0$ a $250,0 \text{ mg L}^{-1}$ no caso do CVorg, $20,0$ a $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ no caso do M+V, $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ no caso do 5-CQA, $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ no caso do EGCG). As concentrações finais dos reagentes no ensaio foram: luminol: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; peróxido de hidrogênio: $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$; hemina: $0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$; antirradicais: Trolox®- $1,0$ a $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; CVorg- $0,5$ a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; M+V- $0,2$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$; 5-CQA- $1,0$ a $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; EGCG- $1,0$ a $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Considerando uma emissão luminosa que varia com o tempo, em um tempo t , o número de fótons emitidos por segundo é $N_{(t)}$. A quantidade total de luz (L) emitida em uma reação quimiluminescente corresponde à integral da intensidade de emissão (I) com o tempo (t de 0 a ∞) (Equação 3).

$$L = \int_0^{\infty} N_{(t)} dt = \int_0^{\infty} I dt \quad (\text{Equação 3})$$

A intensidade de emissão de quimiluminescência da reação depende da concentração de espécies radicalares reativas presentes no meio reacional. Compostos sequestradores de radicais consomem estas espécies, resultando na diminuição da intensidade de emissão. A diferença entre as áreas obtidas na presença

do composto antirradicalar (Figura 21B) e na ausência do mesmo (Figura 21A), denominada de área de supressão, é proporcional ao número de espécies reativas consumidas pelo antirradical.⁵⁰ Sendo assim, a área de supressão deve ser proporcional à concentração do antirradical adicionado ao sistema quimiluminescente e a sua capacidade (Figuras 21A, 21B à 21C).

Os dados obtidos no espectrofluorímetro foram transportados e tratados com o auxílio do software Microcal Origin[®] 8.5 (2010); onde as curvas cinéticas são reproduzidas. A partir da integração dessas curvas, determinaram-se as áreas de supressão de luz para cada concentração de antirradical, obtendo-se uma correlação linear da variação da área de supressão da luz em função da concentração do composto antirradicalar. A capacidade antirradicalar é obtida pela relação entre os coeficientes angulares das correlações dos compostos antirradicalares e o coeficiente angular determinado para o padrão trolox[®] (Figura 22). Desta maneira obtém-se o valor correspondente da atividade antirradicalar em porcentagem de trolox[®] (%T) (Equação 1, pág. 30).

Figura 21: **A:** Cinética de emissão de quimiluminescência da reação de luminol ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) com peróxido de hidrogênio ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), catalisada por hemina ($6,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); **B:** com a adição do composto antirradicalar após 100 s de reação; **C:** A área de supressão obtida pela adição do composto antirradicalar é mostrada em destaque.

Além dos valores obtidos em porcentagem de Trolox®, foram também calculados os valores de TRAP, parâmetro de sequestro total de radicais (“Total Radical Antioxidant Parameter - TRAP”).²³ No sistema luminol/hemina, o valor de TRAP correspondente à concentração do composto antirradical, expressa em mg L⁻¹, que resulta na mesma área de supressão que a concentração de 1 µmol L⁻¹ de Trolox® (Figura 22).

Figura 22: Correlação linear da área de supressão e a concentração de um composto antirradical e da área de supressão e a concentração de trolox® para o cálculo da capacidade antirradicalar em porcentagem de Trolox® (%T) e como valor de TRAP.

3.3.4. Identificação dos constituintes químicos

A identificação dos constituintes das infusões foi feita por dois métodos, as infusões foram analisadas por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-DAD-EM), que foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, e por CLAE-DAD com a técnica de adição de padrão na amostra. Para a técnica de adição de padrão foram feitas soluções de 1,0 g L⁻¹ dos padrões e foi adicionado um volume de 0,5 mL desta solução em 0,5 mL de infusão e a mistura analisada CLAE-DAD.

3.3.5. Quantificação

3.3.5.1 Quantificação da Quercetina

A infusão do chá foi feita a partir de 2,0 g do chá seco adicionado a 100 mL de água Milli-Q a 100°C por 5 minutos; após o resfriamento da solução, a mesma permaneceu por 3 minutos no ultrassom, e então foi filtrada. O pH da infusão foi ajustado para 3,2 com ácido cítrico.⁵¹

Para a hidrólise do CVorg foi adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico 6,0 M a 20 mL da infusão em um balão de fundo redondo, e iniciou-se o aquecimento por 30 minutos a 90°C. Em seguida, a infusão foi resfriada durante 5 minutos até a

temperatura ambiente e mantida por 5 minutos em banho de gelo. A solução foi extraída com 40 mL de acetato de etila, seguida por mais uma extração com mais 30 mL, e a fase orgânica seca com sulfato de sódio. Após filtração, a fase orgânica foi rotaevaporada a 60°C até total retirada do acetato de etila e o resíduo dissolvido em 2,0 mL de metanol. Esta amostra foi submetida à análise por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da quercetina total contida.⁵¹

Para a obtenção da curva de calibração da quercetina foi preparada uma solução estoque de quercetina (padrão comercial) de 1,52 g L⁻¹. A partir dessa solução foram feitas cinco diluições com concentrações de 76 a 380 mg L⁻¹, que foram analisadas por CLAE para obter uma correlação entre a área do pico e a concentração da quercetina. Todos os experimentos efetuados para a obtenção da curva de calibração foram feitas em triplicata.

3.3.5.2 Quantificação de alguns constituintes identificados nas infusões

Para a obtenção das curvas de calibração dos padrões foram preparadas soluções estoques das seguintes concentrações: cafeína de 0,97 g L⁻¹, EC de 1,45 g L⁻¹, EGCG de 2,29 g L⁻¹ e 5-CQA de 1,76 g L⁻¹. A partir dessas soluções foram feitas cinco diluições com concentração de: cafeína de 97 a 485 mg L⁻¹, EC de 145 a 726 mg L⁻¹, EGCG de 229 a 1146 mg L⁻¹ e 5-CQA de 351 a 1053 mg L⁻¹ essas diluições foram analisadas por CLAE para obter as correlações entre a área do pico e a concentração dos padrões. Todos os experimentos efetuados para a obtenção da curva de calibração foram feitas em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de compostos presentes nas infusões

As infusões do CVorg (chá verde orgânico) e M+V (composto comercial de erva-mate com chá verde) foram analisados por CLAE–EM, e os cromatogramas registrados com detecção no UV (Figura 23) sugerem a presença de cinco derivados de ácido cinâmico, um alcaloide e cinco flavonoides glicosilados (Figura 24). Os componentes foram identificados a partir de seus espectros de massas e fragmentos EM/EM gerados em ionização no modo negativo e positivo e posterior confrontação com dados da literatura (Tabela 1).

Figura 23: Cromatogramas das infusões do M+V e CVorg com detecção no UV em 270nm e 320 nm.

A cafeína foi identificada em ambas as infusões, correspondendo ao pico 1 no cromatograma do CVorg e ao pico 2 no M+V; esses picos apresentaram um pico base de m/z 194,8 no modo positivo e uma banda característica da cafeína no espectro no UV (λ max: ≈ 273 nm); não foram observadas fragmentações em MS^2 . Esses dados estão de acordo com dados da literatura e permitem, portanto confirmar a presença da cafeína em ambas as infusões.^{40,52}

Na infusão do M+V foi possível identificar um total de cinco derivados de ácido clorogênico (Figura 24). No cromatograma (Figura 23) os picos 1, 3, 4, 6 e 7 apresentaram espectros no UV característicos de derivados ácidos cafeoilquinico (λ max: ≈ 298 e 325 nm) e com o padrão de fragmentação obtido desses picos, que estão descritas na Tabela 1, foi possível identificar o ácido 3-cafeoilquinico, o ácido 4-cafeoilquinico, o ácido 5-cafeoilquinico, o ácido 3,4-dicafeoilquinico e o ácido 4,5-

dicafeoilquinico, respectivamente. Esses dados foram confrontados com os dados da literatura e os padrões de fragmentação obtidos se mostram muito similares com os dados relatados na literatura para estes compostos.⁵³

Tabela 1: Dados de CLAE-EM das infusões do CVorg e M+V.

Modo	MS	MS ²	Substância	Infusão (Pico)
MS+	194,8	----	Cafeína	CVorg (1), M+V (2)
MS-	352,9	190,9; 179,0; 134,7	Ácido 3-cafeoilquinico	M+V (1)
MS-	352,8	190,9; 178,9; 172,9 134,8	Ácido 4-cafeoilquinico	M+V (3)
MS-	352,8	191,0	Ácido 5-cafeoilquinico	M+V (4)
MS+	465,1	303 (Q [M+H]-Glc)	Quercetina-3-O-glicosídeo	CVorg (5)
MS-	514,8	352,9; 334,9; 172,8	Ácido 3,4-dicafeoilquinico	M+V (6)
MS-	514,8	352,9; 172,8	Ácido 4,5-dicafeoilquinico	M+V (7)
MS+	595	449 ([M+H]-Rha); 287 (K [M+H]-Rha-Glc)	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	CVorg (6)
MS+	611,3	465 ([M+H]-Rha); 303 (Q [M+H]-Rha-Glc)	Quercetina-3-O-rutinosídeo	CVorg (4), M+V (5)
MS+	757,2	595 ([M+H]-Glc); 449 ([M+H]-Glc-Rha); 287 (K [M+H]-Glc-Rha-Glc)	Kaempferol-3-O-glucosilrutinosídeo	CVorg (3)
MS+	773,1	611 ([M+H]-Glc); 465 ([M+H]-Glc-Rha); 303 (Q [M+H]-Glc-Rha-Glc)	Quercetina-3-O-glucosilrutinosídeo	CVorg (2)

*M- Miricetina; Q- Quercetina; K- Kaempferol; Rha- Rhamnose; Glc- Glicose; Gal- Galactose

Nas duas infusões foi possível identificar um total de cinco flavonoides glicosilados (Figura 24). No cromatograma do CVorg os picos 2, 3, 4, 5 e 6 e o pico 5 do cromatograma do M+V produziram espectros no UV característicos de flavonoides glicosilados (λ max: $\approx$ 255 e 355 nm). Com os padrões de fragmentação obtidos desses picos (Tabela 1) foi possível identificar no pico 4 do CVorg e no pico 5 do M+V a quercetina-3-O-rutinosídeo; no pico cromatográfico 2 do CVorg a quercetina-3-O-glucosilrutinosídeo; no pico cromatográfico 3 de CVorg o kaempferol-3-O-glicosilrutinosídeo; o pico cromatográfico 5 do CVorg a quercetina-3-O-glicosídeo; e o pico 6 do CVorg o kaempferol-3-O-rutinosídeo. Esses dados foram confrontados com

os dados da literatura e os padrões de fragmentação obtidos nestes espectros de massas se mostram muito similares com os dados relatados na literatura para estes compostos.⁵¹

Figura 24: Estruturas das substâncias identificadas nas infusões do CVorg e M+V.

A técnica de CLAE-EM não nos permitiu identificar as catequinas que são muito conhecidas em chá verde. A fim de identificar as catequinas presentes no CVorg utilizamos a técnica de adição de padrão analisada por CLAE-DAD, com padrões de catequinas disponíveis em nosso laboratório. Para a realização desse experimento foi preparada a infusão do CVorg que foi analisada por CLAE, por motivo de disponibilidade do equipamento o experimento foi realizado em dois dias diferentes.

Os padrões utilizados foram galocatequina, catequina, epicatequina (EC), galato de epigalocatequina (EGCG) e galato de epicatequina. A Figura 25 mostra os cromatogramas do primeiro dia de experimento da infusão do CVorg e dos cromatogramas da infusão com a adição dos padrões galocatequina, catequina e galato de epicatequina com a atribuição dos picos cromatográficos. A Figura 26 mostra

os cromatogramas do segundo dia de experimento da infusão do CVorg e dos cromatogramas da infusão com as adições dos padrões epicatequina e galato de epigallocatequina com a atribuição dos picos cromatográficos. Podemos notar nos cromatogramas o aumento dos picos referentes aos padrões após a adição dos mesmos na infusão, indicando a presença desses padrões na infusão do CVorg (Figuras 25 e 26). A Tabela 2 apresenta as substâncias identificadas com seus respectivos tempos de retenção. A comparação dos espectros de absorção dos picos com os espectros de absorção dos padrões confirma ainda mais, além dos tempos de retenção na co-injeção, a presença desses padrões na infusão (Figura 27), Na Figura 28 estão representadas as estruturas das substâncias identificadas.

Figura 25: Cromatogramas da infusão de CVorg: a) sem adição; b) com a adição de galocatequina; c) com a adição de catequina; d) com a adição de galato de epicatequina. Pico 1: galocatequina, pico 2: catequina e pico 3: galato de epicatequina.

Figura 26: Cromatograma da infusão de CVorg: a) sem adição; b) com a adição de epicatequina; c) com a adição de galato de epigallocatequina. Pico 3: epicatequina e pico 4: galato de epigallocatequina.

Tabela 2: Tempos de retenção das substâncias identificadas.

Pico	Tempo de retenção (min)	Substância
1	16,1	Galocatequina
2	26,8	Catequina
3	31,4	Epicatequina
4	39,9	Galato de epigallocatequina
5	53,5	Galato de epicatequina

Figura 27: Espectros de absorção dos padrões identificados na infusão do CVorg. Galocatequina (Pico 1); catequina (Pico 2); epicatequina (Pico 3); galato de epigallocatequina (Pico 4) e galato de epicatequina (Pico 5).

Figura 28: Estrutura química das substâncias identificadas na infusão do CVorg.

4.2. Obtenção das curvas de calibração dos chás

Com o objetivo de definir a concentração de material dissolvido nas infusões, sem a necessidade de liofilizar alíquotas das infusões, foram feitos experimentos para correlacionar a quantidade de material dissolvido com o espectro de absorção das infusões. O parâmetro de material total dissolvido é importante para poder correlacionar a capacidade antirradicalar com esta concentração para poder ter uma padronização entre os vários experimentos.

Para a obtenção das curvas de calibração foram inicialmente obtidas as infusões dos dois tipos de chá estudados, Cvorg e M+V, e foram obtidos os seus espectros de absorção (Figura 29). Estas infusões foram liofilizadas e o material sólido obtido redissolvido em água obtendo-se soluções com concentrações (em g L⁻¹) conhecidas, e então foram registrados os espectros de absorção destas soluções (Figura 29). A comparação qualitativa dos espectros das infusões e das soluções do material sólido redissolvido mostra que o material não sofreu, aparentemente, alteração pelo processo de liofilização e redissolução. A infusão e o material redissolvido do CVorg mostra máximo de absorção em 272 nm; entretanto, as soluções equivalentes do M+V mostram máximos em 285 e 325 nm. Este fato indica que a composição das infusões é consideravelmente diferente para os dois chás estudados.

Figura 29: Espectros de absorção das infusões e do material sólido obtido pela liofilização deste, redissolvido em água (CVorg: 97,7 mg L⁻¹; M+V: 51,1 mg L⁻¹). a) chá verde orgânico; b) erva mate e chá verde.

A partir das soluções estoque inicialmente preparadas do liofilizado de cada infusão com a concentração de 1,00 g L⁻¹ foram obtidos os espectros de absorção de diferentes concentrações do liofilizado (para CVorg: 33,3; 50,0; 66,7; 83,3 e 100 mg L⁻¹; para o M+V: 16,7; 25,0; 33,3; 41,7 e 50,0 mg L⁻¹). Os espectros de absorção obtidos para cada concentração (Figura 30) permitem obter curvas de calibração que correlacionam a concentração do liofilizado com a absorbância em 272 nm para a infusão de CVorg e com a absorbância em 325 nm para a infusão de M+V (Figura 31). Com estas curvas de calibração será possível determinar de maneira aproximada a concentração do material dissolvido nas infusões através dos espectros de absorção.

Figura 30: Espectros de absorção do material sólido obtido pela liofilização das infusões de CVorg e M+V.

Figura 31: Correlação linear entre a concentração do material sólido obtido pela liofilização das infusões de CVorg e M+V, redissolvido em água e a absorbância em 272 nm para Cvorg e em 325 nm para M+V.

4.3. Capacidade antirradicar

4.3.1 Métodos colorimétricos

4.3.1.1 Capacidade antirradicalar das infusões

A cinética da reação do trolox® com DPPH• e ABTS^{•+} foi observada durante 30 min (tempo padrão para todas as medidas) pela variação da absorbância em 515 nm para o DPPH• e em 734 nm para o ABTS^{•+} (Figura 32). Em ambos os ensaios, foi observado que sem adição de composto antirradicalar a concentração dos radicais DPPH• e ABTS^{•+} apresentaram-se constantes durante o tempo de monitoramento, indicando sua estabilidade nas condições do ensaio. Portanto, nas condições experimentais, qualquer variação na absorbância em função do tempo ocorre através da reação dos radicais com os compostos antirradicalares.

Figura 32: Cinéticas de reação do trolox® com os radicais DPPH• e ABTS^{•+} medidas pela variação da absorbância em 515 nm e 734 nm, respectivamente.

As curvas cinéticas obtidas para o trolox® nos dois ensaios mostram um decaimento inicial rápido da absorbância, a qual se mantém constante durante o restante do período de observação, indicando que o trolox® reage de maneira muito rápida com ambos os radicais.

Para a determinação da capacidade antirradicalar da infusão do CVorg nos ensaios com o DPPH•, foram utilizados concentrações finais de 2,87 a 14,37 mg L⁻¹; nos ensaios com o ABTS^{•+} foram utilizados concentrações finais de 1,25 a 6,23 mg L⁻¹. Para a infusão do M+V foram utilizados concentrações finais de 5,0 a 25,0 mg L⁻¹ na utilização do radical DPPH•, e concentrações finais de 2,17 a 15,22 mg L⁻¹ na utilização do radical ABTS^{•+} (Figuras 33 e 34).

As concentrações das infusões foram obtidas a partir dos seus espectros de absorção, utilizando-se as respectivas curvas de calibração (Figura 31- Página 41).

Figura 33: Cinética da reação dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} com infusões de CVorg em diferentes concentrações.

Figura 34: Cinética da reação dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} com infusões de M+V em diferentes concentrações.

As curvas cinéticas obtidas em todas as condições mostram um decaimento muito rápido da absorbância seguida por uma variação lenta deste parâmetro (Figura 29, Figura 34). A variação lenta da absorbância mostra-se mais acentuada no caso das infusões de CVorg, quando comparado com os de M+V para ambos os radicais usados. O decaimento rápido da absorbância em ambas as infusões pode indicar a presença de compostos antirradicais mais reativos, já o decaimento lento pode indicar a presença também de compostos antirradicais menos reativos, causando esse comportamento cinético. Neste sentido, o conteúdo destes compostos menos reativos é maior nas infusões de CVorg que nos de M+V.

Para a determinação da capacidade antirradicalar total das infusões dos chás foi efetuada a correlação linear entre a concentração das infusões e a variação da absorbância (ΔAbs) para os dois radicais utilizados e as infusões dos chás CVorg e M+V (Figura 35 e 36).

Figura 35: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH[•] e ABTS^{•+} com a concentração das infusões do M+V.

Figura 36: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH* e ABTS** com a concentração das infusões do CVorg.

Figura 37: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH* e ABTS** com a concentração de trolox®.

A capacidade antirradicalar relativa pode ser calculada a partir das correlações lineares (Figuras 35 e 36) em comparação com os resultados obtidos como trolox® (Figura 37). Estes valores de capacidade antirradicalar de misturas complexas como infusões de chás podem ser mais convenientemente expressos em porcentagens trolox®, obtida diretamente da comparação das inclinações dos gráficos, alternativamente se pode utilizar o parâmetro Total Radical Antioxidant Parameter (TRAP) conforme proposto na literatura para misturas complexas (Tabela 3).²²

Tabela 3: Capacidade antirradicalar relativa das infusões CVorg e M+V.

	% Trolox®		*TRAP (mg L ⁻¹)	
	DPPH*	ABTS**	DPPH*	ABTS**
CVorg	68 ± 4	101 ± 3	0,4 ± 0,1	0,24 ± 0,09
M+V	38 ± 2	37,7 ± 0,9	0,76 ± 0,05	0,64 ± 0,03

*TRAP ("Total Radical Antioxidant Parameter") – concentração de antirradical em mg L⁻¹ com área de supressão equivalente à área de supressão do trolox® na concentração de 1 µmol L⁻¹.

4.3.1.2 Atividade antirradicalar das substâncias identificadas nas infusões

Para a realização deste experimento foram utilizados padrões do ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA), galato de epigalocatequina (EGCG) e epicatequina (EC), essas substâncias foram identificadas nas infusões e foram escolhidas como material de trabalho por estarem disponíveis em nosso laboratório e em uma quantidade suficiente para a realização dos experimentos em triplicata.

Para a determinação da capacidade antirradicalar das substâncias identificadas nas infusões do CVorg e do M+V foi utilizado o mesmo procedimento das infusões e o padrão de comparação também foi o trolox®. As cinéticas da reação do 5-CQA com os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} foram acompanhadas no espectrofotômetro por 30 minutos. A reação do EGCG com o DPPH[•] foi acompanhado por 60 minutos e com o ABTS^{•+} por 40 minutos e a EC com o DPPH[•] e ABTS^{•+} foram acompanhados por 60 minutos (Figura 38, 39 e 40).

Figura 38: Cinética da reação dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} com o padrão 5-CQA em diferentes concentrações.

Figura 39: Cinética da reação dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} com o padrão EGCG em diferentes concentrações.

Figura 40: Cinética da reação dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} com o padrão EC em diferentes concentrações.

Para a determinação da capacidade antirradicalar total dos padrões foi efetuada a correlação linear entre a concentração dos padrões e a variação da absorbância (Δ Abs) para os dois radicais utilizados (Figura 41, 42 e 43).

Figura 41: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH[•] e ABTS^{•+} com a concentração de 5-CQA.

Figura 42: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH[•] e ABTS^{•+} com a concentração de EGCG.

Figura 43: Correlação linear da variação da absorbância de DPPH[•] e ABTS^{•+} com a concentração de EC.

Além de efetuar a correlação da concentração do composto antirradicalar com a variação da absorbância, foi também feita a correlação desta concentração diretamente com a concentração dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} consumidos (Figura 44, 45 e 46).

Figura 44: Correlação linear da variação da concentração do DPPH[•] e do ABTS^{•+} e a concentração do composto antirradicalar 5-CQA.

Figura 45: Correlação linear da variação da concentração do DPPH[•] e do ABTS^{•+} e a concentração do composto antirradicalar EGCG.

Figura 46: Correlação linear da variação da concentração do DPPH[•] e do ABTS^{•+} e a concentração do composto antirradicalar EC.

Desta correlação é possível se obter diretamente o número de radicais de DPPH[•] e ABTS^{•+} sequestrados por molécula de antirradical (Tabela 4).

Tabela 4: Capacidade antirradicalar relativa das infusões CVorg e M+V.

Amostra	DPPH		ABTS	
	%Trolox®	n*	%Trolox®	n*
5-CQA	78 ± 1	1,92 ± 0,02	66 ± 2	1,84 ± 0,05
EGCG	189 ± 12	6,0 ± 0,3	306 ± 20	11,0 ± 0,7
EC	149 ± 11	3,0 ± 0,2	236 ± 5	5,4 ± 0,1

4.3.1 Determinação da capacidade antirradicalar utilizando-se o método quimiluminescente

4.3.1.1 Atividade antirradicalar das infusões

A determinação da capacidade antirradicalar das infusões dos chás foi realizada com as soluções descritas acima, utilizando-se trolox® como padrão de comparação. A cinética da reação do trolox® com ensaio luminol / hemina / H₂O₂ foi observada durante 800 segundos pela variação da intensidade de luz emitida (Figura 47).

As cinéticas das reações das infusões de CVorg e M+V com ensaio luminol / hemina / H₂O₂ foram observadas durante 1200 segundos pela variação da intensidade de luz emitida (Figura 48). As concentrações das infusões foram obtidas a partir dos seus espectros de absorção, utilizando-se as respectivas curvas de calibração (Figura 31- Página 41).

Figura 47: Cinética de emissão da reação de luminol / hemina / H_2O_2 com a adição de diferentes concentrações de trolox®.

Figura 48: Cinética de emissão da reação de luminol / hemina / H_2O_2 com a adição de diferentes concentrações das infusões de M+V e CVorg.

Para a determinação da capacidade antirradicalar total das infusões dos chás foi efetuada a correlação linear entre a concentração das infusões e a área de supressão ($\text{Area}_{\text{sup.}}$) para as infusões dos chás CVorg e M+V (Figura 49).

A capacidade antirradicalar relativa pode ser calculada a partir das correlações lineares (Figura 49) em comparação com os resultados obtidos como trolox® (Figura 50). Estes valores de capacidade antirradicalar de misturas complexas como infusões de chás podem ser mais convenientemente expressos em porcentagens trolox®, obtida diretamente da comparação das inclinações dos gráficos (Figuras 49 e 50), alternativamente se pode utilizar o parâmetro Total Radical Antioxidant Parameter (TRAP) conforme proposto na literatura para misturas complexas (Tabela 5).²²

Figura 49: Correlação linear da área de supressão com a concentração das infusões de M+V e CVogr.

Figura 50: Correlação linear da área de supressão com a concentração de trolox®.

Tabela 5: Capacidade antirradicalar relativa das infusões CVorg e M+V.

	M+V	CVorg
%Trolox®	16 ± 1	$7,7 \pm 0,4$
TRAP (mg L^{-1})	$1,61 \pm 0,04$	$3,30 \pm 0,02$

4.3.1.2 Atividade antirradicalar das substâncias identificadas nas infusões

Para a determinação da capacidade antirradicalar com o ensaio do luminol da 5-CQA e do EGCG foi utilizado o mesmo procedimento das infusões e o padrão de comparação também foi o trolox® (Figura 51).

Para a determinação da capacidade antirradicalar total do 5-CQA e do EGCG foi efetuada a correlação linear entre a concentração desses constituintes e a área de supressão ($\text{Area}_{\text{sup.}}$) (Figura 52).

Figura 51: Cinética de emissão da reação de luminol / hemina / H₂O₂ com a adição de diferentes concentrações de 5-CQA e de EGCG.

Figura 52: Correlação linear da área de supressão com a concentração dos compostos 5-CQA e EGCG.

A capacidade antirradicalar relativa pode ser calculada a partir das correlações lineares (Figura 52) em comparação com os resultados obtidos como trolox® (Figura 53). Esta capacidade antirradicalar pode ser expressa em termos de porcentagem trolox® (% trolox®) ou, como neste caso se trata de compostos puros com concentrações conhecidas, como valores de n , ou seja, número de radicais sequestrados por molécula do antirradical, utilizando-se $n = 2,0$ para trolox® (Tabela 6).

Figura 53: Correlação linear da área de supressão com a concentração de trolox®.

Tabela 6: Capacidade antirradicalar relativa das infusões CVorg e M+V.

	5-CQA	EGCG
%Trolox®	121 ± 11	83 ± 7
n	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1

4.4. Quantificação

4.4.1. Quantificação da quercetina no CVorg

Para a obtenção da quantidade total do flavonoide quercetina presente nas infusões foi realizado primeiramente a hidrólise de ambos os chás para a obtenção dos flavonoides na forma aglicona. Tanto as infusões como as mesmas hidrolisadas foram analisadas por CLAE-DAD, onde foi possível observar a eficiência da hidrólise pelos cromatogramas e os espectros de absorção. Na infusão do CVorg é possível notar a presença de um grande número de picos (Figura 54) com espectros de absorção característicos de flavonoides glicosilados com bandas em aproximadamente 205 nm, 256 nm e 355 nm (Figura 56a), já após sua hidrólise foi possível observar uma grande diferença no cromatograma (Figura 55), apresentando somente três picos majoritários com um espectro de absorção característicos de flavonoides agliconas com bandas em aproximadamente 230 nm, 255 nm e 366 nm (Figura 56b).

No cromatograma da infusão de M+V também é possível notar a presença dos flavonoides glicosilados dado que alguns dos picos (Figura 54) apresentam espectros de absorção característicos, após a hidrólise pode se observar no cromatograma (Figura 55) a presença de ácidos cinâmicos que foram originados da hidrólise dos ácidos clorogênicos que são substâncias que estão presentes em grandes quantidades na erva mate, e a presença de três picos com espectros de absorção característicos de flavonóides.

Figura 54: Cromatogramas das infusões de chás CVorg e M+V.

Figura 55: Cromatogramas das infusões de chás CVorg e M+V hidrolisadas.

Figura 56: Espectros de absorção (a) flavonoide glicosilado; (b) flavonoide aglicona.

Uma solução do padrão da quercetina foi analisada por CLAE nas mesmas condições que as infusões hidrolisadas por comparação do tempo (Figura 57) e do espectro de absorção (Figura 58) pode-se comprovar que a quercetina é o pico com tempo de 18,4 minutos.

Figura 57: Cromatograma da quercetina pura como padrão.

Figura 58: Espectro de absorção do pico a 18,4 min no cromatograma da quercetina.

Para a realização da curva de calibração (Figura 59) foi tomado como base a área do pico da quercetina depois da hidrólise da infusão do CVorg que foi de 234,7057 mAU*min; desse modo foi preparada uma solução estoque de quercetina com concentração de $1,52 \text{ g L}^{-1}$ e a partir dessa solução foram realizadas cinco diluições com concentrações de 76 a 380 mg L^{-1} e analisadas por CLAE para determinação das suas respectivas áreas.

Figura 59: Correlação entre a concentração da quercetina e a área de absorção (mAU) do pico no cromatograma CLAE.

Assim foi possível quantificar a quercetina nas infusões do CVorg e do M+V (após hidrólise), a partir da curva de calibração e a área do pico da quercetina observada nas infusões após a hidrólise foi possível obter a quantidade de quercetina em mg L^{-1} concentração presente na infusão dos chás, obtido a partir da correlação linear da curva de calibração (Tabela 7).

Tabela 7: Valores das áreas obtidas da quercetina nas infusões hidrolisadas e as quantidades encontradas.

Amostra	Área obtida (mAU*min)	Concentração (mg L^{-1})
CVorg	236 ± 3	223 ± 9
M+V	73 ± 3	69 ± 4

4.4.1. Quantificação de alguns compostos identificados nas infusões

Com a identificação parcial dos constituintes, foi possível escolher alguns compostos, de acordo com a disponibilidade de padrões, para realizar a quantificação dos mesmos. Para o CVorg foi escolhido a cafeína (1), a epicatequina (2) e o galato de epigallocatequina (3), já para o M+V foi escolhido a 5-CQA (4), na Figura 60 são mostrados os cromatogramas das infusões com os picos referentes a cada substância.

Figura 60: Cromatogramas das infusões de CVorg e M+V respectivamente, com a indicação dos picos correspondentes às substâncias identificadas.

Deste modo foram preparadas soluções estoque e suas diluições foram analisadas por CLAE-DAD, obtendo-se desta maneira uma curva de calibração da área do pico no cromatograma com a concentração do analito (Figura 61); a análise foi feita em triplicata.

Figura 61: Curva de calibração dos compostos identificados nas infusões.

As áreas encontradas nas infusões das substâncias em análise são listadas na Tabela 8, junto com as concentrações obtidas em mg L^{-1} , expressa a concentração do padrão analisado nas infusões, calculada diretamente pela correlação linear obtida das respectivas curvas de calibração

Tabela 8: Áreas dos picos no cromatograma dos compostos identificados e concentrações destas substâncias nas infusões.

Padrões	Área obtida (mAU*min)	Concentração^a (mg L⁻¹)
Cafeína	349 ± 7	420 ± 13
EGCG	343 ± 5	879 ± 24
Epicatequina	82 ± 1	347 ± 8
5-CQA	674 ± 14	642 ± 18

5. Discussão

Neste trabalho foi realizada a identificação dos compostos presentes em chás comerciais, a quantificação de alguns constituintes identificados nesses chás e foi determinada a capacidade antirradicalar das infusões e de alguns compostos identificados por diferentes métodos.

5.1. Identificação dos compostos presentes nas infusões

Na infusão do CVorg foi possível identificar cinco catequinas, galocatequina, catequina, epicatequina, galato de epigalocatequina e galato de epicatequina, identificados pelo método de adição de padrões analisadas por CLAE-DAD, e por CLAE-EM foram identificados cinco flavonoides glicosilados, quercetina-3-O-glicosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-glucosilrutinosídeo e quercetina-3-O-glucosilrutinosídeo e o alcaloide cafeína. Pelo mesmo método CLAE-EM na infusão do M+V foram identificados cinco derivados de ácido clorogênico, ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, além destes ácidos, foram identificados o alcaloide cafeína e o flavonoide quercetina-3-O-rutinosídeo. Todas as substâncias identificadas em ambas as infusões já foram relatadas na literatura.^{40, 47}

5.2. Quantificação de compostos presentes nas infusões

Após a identificação de alguns constituintes nas infusões do CVorg e do M+V foram escolhidas algumas substâncias para serem quantificados de acordo com a disponibilidade desses padrões. Para quantificar os flavonoides glicosilados foi feita uma hidrólise das infusões para quantificar a quercetina total presente nos chás. As concentrações obtidas estão na Tabela 9 com as concentrações encontradas na literatura.

Tabela 9: Concentrações obtidas nas infusões e dados da literatura.

Padrão		Conc. (mg g ⁻¹ de folhas)	Conc. Lit. (mg g ⁻¹ de folhas)
Quercetina	(CVorg)	4,0 ± 0,2	2,5 a 3,2 ⁵⁴ / 1,8 a 4,0 ⁵⁵
	(M+V)	1,23 ± 0,07	2,2 ⁵⁶
Cafeína (CVorg)		7,5 ± 0,1	20,8 no verão 13,6 na primavera. ³⁷
EGCG (CVorg)		15,70 ± 0,07	11 a 50 ⁵³
EC (CVorg)		6 ± 1	2,3 a 8,5 ⁵³
5-CQA (M+V)		11,5 ± 0,3	8,2 a 13,2 ⁵⁷

O teor de quercetina total obtido para o CVorg foi de $4,0 \text{ mg g}^{-1}$ em folhas um dos valores mais altos em comparação aos valores encontrados na literatura. Um possível motivo para justificar essa diferença seria que o chá verde estudado neste trabalho é orgânico, deste modo possui um tratamento diferente desde no seu cultivo, podendo gerar diferentes quantidades de constituintes nos chás. Outro aspecto que também podem interferir no resultado é de que o chá em estudo foi produzido no Brasil que possui um solo rico em nutrientes e um clima favorável.

Para o M+V, Bojic e colaboradores quantificaram os flavonoides quercetina, kaempferol e rutina, além de outros compostos em soluções aquosas erva mate. O teor de quercetina total obtido para o M+V foi de $1,23 \text{ mg g}^{-1}$ em folha, menor em comparação aos valores encontrados na literatura. Um possível motivo para a diferença seria que os métodos de preparo da infusão, hidrólise e extração são diferentes.

Saito e colaboradores quantificaram cafeína em chá verde brasileiro colhido em duas estações do ano – verão e primavera. Os teores de cafeína encontrados foram, em média, $20,8 \text{ mg g}^{-1}$ em folha seca no verão e $13,6 \text{ mg g}^{-1}$ em folha seca na primavera.³⁷ O teor de cafeína obtido no presente trabalho é menor que o valor encontrado na literatura; não é possível afirmar o motivo da diferença, porém as diferenças observadas podem estar relacionadas com a época e com o local de coleta do material vegetal, ou ao diferente processamento das folhas.

Matsubara e colaboradora quantificaram catequinas em chá comercializados no Brasil. O teor de epicatequina e galato de epicatequina obtidos no estudo encontra-se dentro da faixa encontrada na literatura.⁵⁴ Rodriguez-Amaya e colaboradores quantificaram compostos fenólicos em bebidas de Erva-mate (chimarrão e tererê) comercializados no Brasil. O teor de 5-CQA obtido nesse estudo também se encontra dentro da faixa encontrada na literatura.⁵⁷

Na infusão do CVorg foi possível notar que a quantidade das catequinas estudadas, epicatequina e galato de epigallocatequina, encontraram-se dentro da faixa de concentrações da literatura, já a cafeína encontrou-se um teor menor do que o da literatura, já a quercetina total encontrada é comparada a maior concentração encontrada na literatura. O M+V apresentou o teor de quercetina total menor que o encontrado na literatura e o 5-CQA um teor dentro dos limites encontrado na literatura. Essas diferenças com os dados da literatura podem ser explicada por vários motivos, lugar de cultivo, clima na coleta, riqueza do solo, tempo de extração, entre outros vários fatores que podem afetar a quantidade dos constituintes nos chás.

5.3. Determinação da atividade antirradicalar

O método colorimétrico consiste basicamente na capacidade de um antirradical em reduzir a espécie radicalar, observada pela alteração da absorção inicial da solução. A solução radical DPPH[•] apresenta uma coloração púrpura, observada em uma banda de absorção característica de 515 nm. Durante a reação do DPPH[•] com um composto antirradicalar a intensidade da coloração púrpura do DPPH[•] começa a diminuir pela redução sofrida pelo antirradical (Esquema 1), essa variação pode ser monitorada pela variação da absorção do sistema em 515 nm.

Esquema 1: Mecanismo de reação entre o DPPH e um antirradicalar AOH e mudança da coloração da reação.

A solução do radical ABTS^{•+} apresenta uma coloração verde, devido a uma banda de absorção característica com máximo em 734 nm. Durante a reação do ABTS^{•+} com um composto antirradicalar a intensidade da coloração esverdeada do ABTS^{•+} começa a diminuir pela redução sofrida pelo antirradical (Esquema 2), essa variação pode ser monitorada pela variação da absorção do sistema em 734 nm.

Esquema 2: Reação de ABTS^{•+} com um composto antirradicalar AOH e mudança da coloração da solução do radical ABTS^{•+}.

O método quimiluminescente é baseado na reação do luminol com peróxido de hidrogênio e catalisado por hemina (Esquema 3), desenvolvida e estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa.²⁸ A emissão de luz pela reação de oxidação do luminol pode

ser interrompida pela adição de um composto antirradicalar, que interage com os radicais formados durante a reação (Esquema 3). O composto antirradicalar é consumido pela reação com os radicais e a emissão de luz será reestabilizada após o consumo completo do composto antirradicalar. Sendo assim, a inibição da emissão de luz pelo composto antirradicalar corresponde ao número de radicais sequestrados por ele, consequentemente, a área de inibição da emissão (vide Figura 21, Materiais e Métodos, p. 32) é proporcional à concentração do composto antirradicalar e sua capacidade de sequestro de radicais.²⁸

Esquema 3: Reação quimiluminescente de luminol com peróxido de hidrogênio, catalisada por hemina, e inibida pela adição de um composto antirradicalar AOH.

5.3.1. Capacidade antirradicalar das infusões

Os valores de capacidade antirradicalar obtidos com o método colorimétrico são idênticos para o caso das infusões de M+V, entretanto diferentes para as infusões de CVorg. As infusões do CVorg possuem capacidade antirradicalar maior que o M+V conforme determinado com ambos os radicais utilizados (Tabela 10). No ensaio com ABTS^{•+}, as infusões de CVorg mostraram a mesma capacidade antirradicalar que soluções de trolox® puros. O valor de 101% trolox® obtido neste ensaio significa que a infusão do chá CVorg possui a mesma capacidade antirradicalar que a solução de trolox® puro da mesma concentração em g L⁻¹.

Tabela 10: Capacidade antirradicalar relativa das infusões CVorg e M+V.

		CVorg	M+V
% Trolox®	DPPH [•]	68 ± 4	38 ± 2
	ABTS ^{•+}	101 ± 3	37,7 ± 0,9
	Luminol	7,7 ± 0,4	16 ± 1
*TRAP (mg L ⁻¹)	DPPH [•]	0,4 ± 0,1	0,76 ± 0,05
	ABTS ^{•+}	0,24 ± 0,09	0,64 ± 0,03
	Luminol	3,30 ± 0,02	1,61 ± 0,04

*TRAP ("Total Radical Antioxidant Parameter") – concentração de antirradical em mg L⁻¹ com área de supressão equivalente à área de supressão do trolox® na concentração de 1 µmol L⁻¹.

Frente ao ensaio do luminol as infusões não apresentaram uma atividade elevada dado que o M+V apresentou uma capacidade de aproximadamente 16% enquanto o CVorg mostrou metade da atividade obtida pelo M+V de aproximadamente 8 %, esse resultado é diferente do obtido frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, que ambos mostraram um potencial antirradicalar maior, o CVorg mostrou uma maior capacidade frente a esses dois radicais.

A infusão de CVorg apresentou uma capacidade antirradicalar similar ao trolox® frente ao radical ABTS^{•+}, mostrando ter um potencial antirradicalar maior que a infusão de M+V, em ambos os radicais. No método quimiluminescente as infusões não mostraram um potencial antirradicalar muito elevado se comparado com o trolox®, mas entre as infusões o M+V apresentou uma maior capacidade que o CVorg.

5.3.2. Capacidade antirradicalar das substâncias identificadas

Os valores de capacidade antirradicalar obtidos para os compostos se comportaram diferentes para os dois radicais livres utilizados (Tabela 11). O 5-CQA foi a substância que teve uma capacidade antirradicalar semelhante frente aos dois radicais, tendo uma capacidade um pouco mais elevada frente ao radical DPPH[•]. Já as catequinas analisadas mostraram-se uma capacidade um pouco mais elevada frente ao radical ABTS^{•+}. O EGCG possui uma atividade mais elevada que o EC, com uma capacidade antirradicalar de 189% frente ao DPPH[•] e de 306% frente ao ABTS^{•+}, e a EC de 149% frente ao DPPH[•] e de 236% frente ao ABTS^{•+}, ambas mostraram um valor maior que 100% indicando que são mais reativas que o padrão utilizado trolox®. Esses valores podem justificar a capacidade antirradicalar do CVorg frente os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, pois as catequinas apresentaram uma alta capacidade antirradicalar, assim como o CVorg as catequinas foram mais ativas frente ao ABTS^{•+}.

As substâncias identificadas nas infusões também foram avaliadas pelo ensaio do luminol. Foram analisadas a catequina EGCG identificada do CVorg e o ácido clorogênico 5-CQA identificada do M+V. Ambos compostos apresentaram uma boa correlação linear da variação da área de supressão de luz em função da concentração (Tabela 11).

O composto 5-CQA apresentou uma atividade maior entre os compostos estudados no ensaio do luminol, com exceção da epicatequina já estudada pelo nosso grupo⁵⁸, a porcentagem maior que 100% indica que esse composto apresenta um potencial antirradicalar mais alto que o composto padrão trolox®. O 5-CQA apresentou uma capacidade elevada frente a esse ensaio comparado com o ensaio com os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. Já a catequina EGCG apresentou uma atividade de 83%,

uma atividade relativamente alta, porem apresentou uma melhor atividade frente aos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•].

Tabela 11: Capacidade antirradicalar obtida de algumas substâncias identificadas nas infusões dos chás.

		5-CQA	EGCG	EC
% Trolox®	DPPH [•]	78 ± 1	189 ± 12	149 ± 11
	ABTS ^{•+}	66 ± 2	306 ± 20	236 ± 5
	Luminol	121 ± 11	83 ± 7	186*
n	DPPH [•]	1,92 ± 0,02	6,0 ± 0,3	3,0 ± 0,2
	ABTS ^{•+}	1,84 ± 0,05	11,0 ± 0,7	5,4 ± 0,1
	Luminol	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,7 ⁵⁸

A capacidade antirradicalar frente ao DPPH[•] obtida para cada composto foi relacionada com a respectiva quantidade encontrada nas infusões para estimar a contribuição de cada substância para esta capacidade. Para facilitar essa comparação as atividades foram relacionadas com a concentração em mg por g de chá seco, dado que as concentrações das infusões utilizadas na determinação da capacidade antirradicalar foram obtida em relação a massa do chá seco pela curva de calibração. A contribuição de cada composto para a capacidade total da infusão (CAOH) pode ser calculada a partir da sua contribuição para a massa de chá seco e a sua capacidade antirradicalar expressa em % Trolox (Tabela 12).

Tabela 12: Contribuição das substâncias identificadas para a capacidade antirradicalar (CAOH) das infusões frente ao radical DPPH[•].

Padrão	Conc. (mg g ⁻¹ de chá seco)	CAOH (%)
5-CQA (M+V)	47 ± 3	3,7 ± 0,6
Quercetina (M+V)	5,0 ± 0,4	0,87 ± 0,02
Quercetina (CVorg)	20 ± 2	3,5 ± 0,1
EGCG (CVorg)	80 ± 8	15 ± 2
EC (CVorg)	32 ± 3	4,8 ± 0,2

Na infusão de CVorg a catequina EGCG é a substância encontrada em maior quantidade e também a que mais contribuição com a capacidade antirradicalar do chá frente ao radical DPPH[•] dentre os compostos analisados. Na infusão do M+V a substância 5-CQA contribuiu mais que a quercetina uma vez que na infusão desta chá não foram identificados muitos flavonóides (Tabela 12).

As capacidades antirradicais do flavonoide quercetina e do flavonoide glicosilado quercetina-3-O-rutinosideo (rutina) já foram estudados pelo nosso grupo, com um valor de %Trolox® de 173 ± 8 e 34 ± 4 , respectivamente, frente ao radical DPPH'.²¹ De modo geral os flavonoides glicosilados possuem uma capacidade antirradicalar menor que os flavonoides agliconas. Nas infusões estudadas foram identificados somente flavonoides glicosilados, além disso, as quantidades de quercetina livre encontradas nas infusões após a hidrólise foram pequenas comparadas com os outros compostos. A partir destes dados se pode concluir que as quantidades de flavonoides glicosilados presentes nas infusões dos dois chás devem ser baixas.

A contribuição da capacidade antirradicalar da quercetina total não foi muito elevada devido à quantidade não ser muito grande comparada aos outros compostos, é possível dizer que as catequinas analisadas contribuem mais na capacidade antirradicalar da infusão de CVorg frente ao radical DPPH' do que os flavonoides glicosilados (Tabela 12).

6. Conclusão

- Na infusão do CVorg foi possível identificar cinco flavonoides glicosilados, quercetina-3-O-glicosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-glucosilrutinosídeo e quercetina-3-O-glucosilrutinosídeo, além de cinco catequinas, catequinas, galocatequina, catequina, epicatequina, galato de epigallocatequina e galato de epicatequina e o alcaloide cafeína.
- Na infusão do M+V foi possível identificar cinco derivados de ácido clorogênico, ácido 3-cafeoilquinico, ácido 4-cafeoilquinico, ácido 5-cafeoilquinico, ácido 3,4-dicafeoilquinico e ácido 4,5-dicafeoilquinico, além de um flavonóide glicosilado quercetina-3-O-rutinosídeo e o alcalóide cafeína.
- Foi possível quantificar alguns dos compostos identificados, as catequinas EC e EGCG que foi encontrada em maior concentração dentre as substâncias analisadas no CVorg, além das catequinas foi ainda quantificado o alcaloide cafeína. No M+V foi quantificado o 5-CQA. Em ambas as infusões foi quantificado a quercetina total, mostrando que o CVorg apresenta uma maior quantidade deste flavonóide.
- A capacidade antirradicalar das infusões, determinada pelo método colorimétrico, se mostrou mais elevada para CVorg do que para M+V com ambos radicais. Já no método quimiluminescente o M+V apresentou uma maior capacidade do que o CVorg.
- As infusões do Cvorg e M+V apresentaram capacidade antirradicalar elevada, comparável com a de trolox puro, indicando a presença de substâncias com alto potencial antirradicalar. Este fato indica a que as infusões podem apresentar também uma alta capacidade antioxidante *in vivo*.
- A capacidade antirradicalar de cada substância frente ao radical DPPH[•] foi correlacionada com a sua quantidade presente nas infusões, assim foi possível verificar que a catequina EGCG apresenta uma elevada contribuição para a capacidade antirradicalar do CVorg.

7. Referencias Bibliográficas

- ¹ Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, **29**, 113-123 (2006).
- ² Bastos, E. L.; “Desenvolvimento de um ensaio para determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais através da quimiluminescência do luminol”. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade de São Paulo; (2000).
- ³ Ito, N.; Fukushima, S.; Tsuda, H.; Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response By BHA, BHT and Other Antioxidants. *CRC Critical Rev. Toxicol.*; **15**, 109-150 (1985).
- ⁴ Dorko, C.; Antioxidants used in foods. *Food Technol.*; **48**, 33-34 (1994).
- ⁵ Aherne, S. A.; O’Brien, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81 (2002).
- ⁶ Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. & Cross, C.E.; Free Radicals, antioxidants, and Human Disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*; **119**, 598-620 (1992).
- ⁷ SILVA, M. B. S. Flavonóides com capacidade antioxidante –Química Aplicada – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa (2011). Disponível em:< <http://www.ipgs.com.br/cursos/documents/flavonoidescomcapacidadeantioxidante.pdf>> Acesso em: abr. (2013).
- ⁸ Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G.; Augusto, O.; Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, **30**, 441-449 (2007).
- ⁹ Melo, E. A.; Guerra, N.B.; Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA.*; **36**, 1-11 (2002).
- ¹⁰ Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C.; Commentary: Antioxidant Characterization Methodology and Mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1341-1348 (1995).
- ¹¹ Behling, E. B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M.L.P.; Flavonoid quercetin: General aspects and biological actions. *Alim. Nutr.*, **15**, 285-292 (2004).
- ¹² Prior, R. L.; Cao, G.; In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*, **27**, 1173-1181 (1999).
- ¹³ Liu, Z. Q.; Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. *Chem. Rev.*, **110**, 5675–5691 (2010).
- ¹⁴ Ingold, K. U.; Pratt, D. A.; Advances in Radical-Trapping Antioxidant Chemistry in the 21st Century: A Kinetics and Mechanisms Perspective. *Chem. Rev.*, **114**, 9022–9046 (2014).
- ¹⁵ Folin, O.; Ciocalteu, V.; Tyrosine an tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**, 627-650 (1927).
- ¹⁶ Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. & Cross, C.E.; Free Radicals, antioxidants, and Human Disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*; **119**, 598-620 (1992).
- ¹⁷ Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G.; Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, **14**, 303-311 (1993).
- ¹⁸ Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K.; Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302 (2005).
- ¹⁹ Re, R.; Pellegrin, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Ang, M.; Rice-Evans, C.; Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 1231-1237(1999).
- ²⁰ Blois, M. S.; Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*; **181**, 1199 – 1200 (1958).
- ²¹ De Oliveira, S.; “Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis”. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade de São Paulo; (2011).
- ²² Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S.; Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.*, **187**, 33-37 (1985).
- ²³ Romay, C.; Castillo, M. C.; Pascual, C.; Campos, A. M.; Escobar, J.; Lissi, E. A.; Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. *Cienc. Cult.*, **48**, 86-95 (1996).
- ²⁴ Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccin, C.; Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 1106-1114 (2000).
- ²⁵ Albrecht, H. O.; Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide. *Z. Phys. Chem.*, **135**, 321-330 (1928).
- ²⁶ Marquette, C. A.; Blum, L. J.; Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*; **385**, 546-554 (2006).

- ²⁷ Ferreira, E. C.; Rossi A. V.; A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*, **25**, 1003-1011 (2002).
- ²⁸ Bastos, E. L.; Romoff, P.; Eckert, C. R.; Baader, W. J.; Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-Hemin-induced luminol chemiluminescence. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7481-7488 (2003).
- ²⁹ Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Bastos, E. L.; Chemiluminescence of organic peroxides. Em: *The Chemistry of Peroxides*; Rappoport, Z., ed.; Wiley & Sons, Chichester, cap. 16, 1211 - 1279 (2006).
- ³⁰ Lissi, E.; Pascual, C.; Castillo, M. D.; Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comm.*, **17**, 299-311 (1992).
- ³¹ Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Castillo, M. D.; Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 153-158 (1995).
- ³² Eckert, C. R. "Determinação da Atividade Anti-radicalar de Flavonóides e Extratos de Espécies de *Baccharis* Através da Reação Quimiluminescente do Luminol", *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Química, Universidade de São Paulo; (2006).
- ³³ Peralta, R. M.; Nishiyama, M. F.; Costa, M. A. F.; Costa, A. M.; Souza, C. G. M.; Boer, C. G.; Bracht, C. K. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis var. assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **30**, 191-1969 (2010).
- ³⁴ Anesini, C.; Ferraro, G. E.; Filip, R. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9225-9229 (2008).
- ³⁵ COSTA, P. P.; SILVA, C. D.; Uma xícara (chá) de Química. *Rev. Virtual Química*, **3**, 27-36 (2011).
- ³⁶ Gosmann, G.; Saito, S. T.; Fröhlich, P. E.; Bergold, A. M.; Full validation of a simple method for determination of catechins and caffeine in Brazilian green tea (*Camellia sinensis var. assamica*) using HPLC. *Chromatographia*, **65**, 607-610 (2007).
- ³⁷ Saito, S. T.; Gosmann, G.; Safri, J.; Presser, M.; Richter, M. F.; Bergold, A. M. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis var. assamica* IAC-259 cultivar) extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9409-9414 (2007).
- ³⁸ Saito, S. T.; Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis var. assamica*) Cultivar IAC-259. *Dissertação de Mestrado*; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2007).
- ³⁹ Vinson, J. A.; Dabbagh, Y. A.; Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, **18**, 1067-1075, (1998).
- ⁴⁰ Del-Rio, D.; Stewart, A. J.; Mullen, W.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Brighenti, F.; Crozier, A. HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2807-2815 (2004).
- ⁴¹ Wang, H.; Helliwell, K.; Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, **70**, 337-344 (2000).
- ⁴² Ruan, J.; Effect of root zone pH and form and concentration of nitrogen on accumulation of quality-related components in green tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 1505-1516 (2007).
- ⁴³ Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y. S.; Effects of extractions solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem.*, **99**, 835-841 (2006).
- ⁴⁴ Bastos, D. H. M.; Saldanha, L. A.; Catharino, R. R.; Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Carvalho, P. O.; Eberlin, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Molecules*, **12**, 423-432 (2007).
- ⁴⁵ Pan, X.; Niu, G.; Liu, H.; Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Proc.*, **42**, 129-133 (2003).
- ⁴⁶ 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 Chem.*, **96**, 597-605 (2006).
- ⁴⁷ Mejia, E. G.; Heck, C. I. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J. Food Sci.*, **72**, 138- 151 (2007).
- ⁴⁸ Groppo, M. Aquifoliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4904>) (2013).
- ⁴⁹ De Freitas, G. B. L.; Andriola, A.; Gauer, A. G.; Ienk, L. S. Da S. Erva- Mate, muito mais que uma tradição, um verdadeiro potencial terapêutico. *Rev. Elet. de Farmácia*, **VIII**, 101-113, (2011).

-
- ⁵⁰ Burton, G. H.; Hughes, L.; Ingold, K. U.; Antioxidant Activity of Phenols to Vitamin E – Are There Chain-Breaking Antioxidant Better than α -tocopherol? *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5950-5951 (1983).
- ⁵¹ Samanidou, V.; Tsagiannidis, A.; Sarakatsianos, I. Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *J. Sep. Sci.*, **35**, 608- 615 (2012).
- ⁵² Scoparo, T. C. Análise dos polissacarídeos presentes em *Camellia sinensis* e desenvolvimento de cromatografia líquida bidimensional abrangente para compostos de baixa massa molecular. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná (2011).
- ⁵³ Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of Chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2900-2911 (2003).
- ⁵⁴ Matsubara, S.; Rodriguez-Amaya, D.B. Conteúdo de miricetina, quercetina e caempferol em chás comercializados no Brasil. *Rev. Ciên. Tecnol. Aliment.*, **26**, 380-385 (2006).
- ⁵⁵ Wang, H.; Helliwell, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res. Int.*, **34**, 223-227, 2001.
- ⁵⁶ Bojic, M.; Haas, V. S.; Saric, D.; Males, C. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-6, (2013)
- ⁵⁷ Rodriguez-Amaya, D. B.; Peres, R. G.; Tonin, F. G.; Tavares, M. F. M. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. *Molecules*, **18**, 3859-3871 (2013).
- ⁵⁸ Baader, W. J.; Eckert, C. R.; Medeiros, M. M.; Romoff, P. Atividade anti-radicalar de flavonoides determinada por quimiluminescência do luminol induzida por H₂O₂-hemina. Painel apresentado na 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, (2005).

Súmula Curricular

1. DADOS PESSOAIS:

Cinthia Indy Tamayose.

São Paulo- SP- 13/09/1988

E-mail- cinthiatamay@gmail.com

CVlattes: <http://lattes.cnpq.br/6140980886858447>.

2. FORMAÇÃO

Bacharelado em Química pela Universidade Presbiteriana Mackenzie, no período de 02/2008 à 12/2011.

3. ATIVIDADES ACADÊMICAS

Artigos publicados:

1. Viegas, G. Y. M.; Tamayose, C. I.; Ferreira, M. J. P.; Favero, O. A.; Baader, W. J.; Romoff, P. Evaluation of the antiradical capacity of *Baccharis oxyodonta* extracts using luminol chemiluminescence. *Luminescence*, v. 29, p. 90, 2014.

Trabalhos apresentados em congressos:

1. Tamayose, C. I.; Baader, J. W.; Romoff, P. Avaliação do potencial antirradicalar e identificação e quantificação de constituintes químicos do chá *Camellia sinensis*. 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Natal- RN, v. 37. p. QPN- 019, 2014.
2. Tamayose, C. I.; Baader, J. W.; Romoff, P. Constituintes químicos e avaliação do potencial antirradicalar de infusões de chás (*Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis*). 36º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia- SP, v. 36, p. QPN- 061, 2013.
3. Oliveira, L. A. P.; Tamayose, C. I.; Barufaldi Neto, J.; Romoff, P.; Favero, O. A.; Felício, J. D.; Gonzalez, E.; Apel, M.; Henriques, A. T.; Ferreira, M. J. P. Composição química e atividade fungicida dos óleos voláteis dos indivíduos masculino e feminino de *Baccharis oxyodonta* (Asteraceae). 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia- SP, v. 35. p. QPN- 047, 2012.
4. Tamayose, C. I.; Oliveira, L. A. P.; Romoff, P. ; Favero, O. A.; Felício, J. D.; Gonzalez, E.; Lago, J. H. G.; Ferreira, M. J. P. Inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* através do poligodol isolado das cascas do tronco de *Drymis brasiliensis* (Winteraceae). 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia- SP, v. 35. p. QPN- 049, 2012.
5. Tamayose, C. I.; Romoff, P.; Lago, J. H. G; Sartorelli, P.; Pinto, E. G.; Tempone, A. G.; Velozo, L. S. M.; Kaplan, M. A. C.; Ferreira, M. J. P. Potencial leishmanicida e tripanocida do flavonóide isolado da fase n-butanólica de *Peperomia obtusifolia*

(Piperaceae). 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, v. 35. p. QPN- 019, 2012.

6. Tamayose, C. I.; Baptista, E. M.; Ferreira, M. J. P.; Romoff, R.; Lago, J. H. G.; Velozo, L. S. M.; Kaplan, M. A. C.. Amidas com atividade antirradicalar de *Peperomia obtusifolia*. 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis- SC, v. 34. p. QPN- 129, 2011.

7. Tamayose, C. I. ; Romoff, P.; Favero, O. A.; Lago, J. H. G.; Sartorelli, P.; Reimao, J. Q.; Lourenco, W. C.; Tempone, A. G.; Hristov, A. D.; Santi, S. M.; Ferreira, M. J. P.. Anti-malarial and anti-trypanosomal activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). 3rd Brazilian Conference on Natural Products, XXIX RESEM and VII SFL, Ouro Preto- MG, v. 3. p. P- 214, 2011.

8. Baptista, E. M.; Tamayose, C. I.; Romoff, P.; Alexiou, A. D. P.; Ferreira, M. J. P. Flavanones from *Piper carniconnectivum* C. DC. (Piperaceae). 3rd Brazilian Conference on Natural Products, XXIX RESEM and VII SFL, Ouro Preto- MG, v. 3. p. P- 226, 2011.

9. Tamayose, C. I.; Baptista E. M.; Romoff, R.; Lago, J. H. G.; Velozo, L. S. M.; Kaplan, M. A. C.; Ferreira, M. J. P. Novel amides from *Peperomia obtusifolia* (L.) A. Dietr.(Piperaceae). 3rd Brazilian Conference on Natural Products, XXIX RESEM and VII SFL, Ouro Preto- MG, v. 3. p. P- 214, 2011.

10. Baptista, E. M.; Tamayose, C. I.; Romoff, P.; Favero, O. A.; Buturi, F. O. S.; Henriques, A. T.; Apel, M.; Ferreira, M. J. P. Chemical composition of volatile oil of the stems, leaves and flowers from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). 3rd Brazilian Conference on Natural Products, XXIX RESEM and VII SFL, Ouro Preto- MG, v. 3. p. P- 225, 2011.

11. Tamayose, C. I. ; Baptista, E. M.; Ferreira, M. J. P.; Romoff, P. Flavonóide C-Glicosilado de *Peperomia obtusifolia*: Isolamento e Avaliação da Atividade Antirradicalar. 10º Congresso Nacional de Iniciação Científica CONIC-SEMESP, São Paulo-SP, v. 10, 2010.

Participação em reuniões científicas:

1. 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2014. (Congresso).
2. 36º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2013. (Congresso).
3. 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2012. (Congresso).
4. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011. (Congresso).
5. 3rd Brazilian Conference on Natural Products. 2011. (Congresso).
6. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2010. (Congresso).
7. 10º Congresso Nacional de Iniciação Científica. 2010. (Congresso).