

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Tema:

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ VERDE E
PRETO –*Camellia sinensis*(L)**



AUTOR:

NHACUTONE, ELÍDIO ALFREDO

Maputo, Novembro de 2014

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Tema:

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ VERDE E
PRETO – *Camellia sinensis*(L)**



AUTOR:

NHACUTONE, ELÍDIO ALFREDO

SUPERVISOR:

PROF. DOUTOR FELISBERTO PAGULA

Maputo, Novembro de 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, pessoas que não mediram esforços em me ajudar nesta e em todas as batalhas da minha vida.

Em especial dedico este trabalho à Odília Dinis, Wesley, Madalena e Yasmy, pois muito do tempo destinado a este trabalho é vosso por direito.

Agradecimentos

Em primeiríssimo lugar agradeço a DEUS, todo-poderoso e misericordioso, pela vida, bênção e por estar sempre comigo iluminando os meus passos.

Agradeço aos meus pais, Alfredo Nhacutone e Filomena Jonasse, por todo o amor que têm por mim e pela preocupação e esforços feitos para minha educação.

Agradeço a minha namorada Udilia Dinis Mondlane pelo apoio constante durante a realização deste trabalho e pela química que criou entre nós.

Agradeço ao meu padrinho Adérito Pacule pelo apoio constante durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus irmãos, minhas cunhadas, meus sobrinhos e meus primos pelo apoio, incentivo e muito carinho.

Agradeço ao meu supervisor Prof. Doutor Felisberto Pagula pela paciência, ensinamentos, orientação, confiança em mim depositada, assistência e incentivo durante todas as fases do meu trabalho.

Agradeço imenso à Prof(a). Doutora Fung, pela paciência na revisão ortográfica do trabalho.

À dra Amélia, vai o meu muito obrigado pela amizade e apoio que me concedeu durante as práticas laboratoriais.

Agradeço imenso a todo o corpo docente da Faculdade de Ciências, e especialmente os do Departamento de Química, pelo esforço dado para a minha educação.

Aos meus colegas e amigos Mário Ussevane Jr, Mário Ouana, Leonardo Jossias, Belmiro Guele, Abel João, Fernando Cuamba, João Conjo, Ângelo Teófilo, Emerson, Natalio Ndeve, Euclides Chibindje, Zelio Chibindje, Abel Nandza, Idalino Chone, Deotelio Matsinhe, Aurélio Mahumane, e a todos aqueles que aqui não foram mencionados - mas que sempre desejaram o meu sucesso - agradeço bastante pela companhia que me fizeram durante o curso.

Declaração de Honra

Declaro por minha honra que este trabalho foi feito por mim com base no material referenciado ao longo do texto

(Elídio Alfredo Nhacutone)

‘As vezes ouço passar o vento;
e só de ouvir o vento passar,
vale a pena ter nascido.’

(Fernando Pessoa)

‘ Você nasceu para vencer,
mas para ser um vencedor,
você precisa planejar para vencer,
se preparar para vencer,
e esperar vencer.’

(Zig Ziglar)

RESUMO

O chá produzido a partir da planta *C. sinensis* é considerado a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água. O consumo de chá tem sido associado a muitos benefícios para a saúde. O chá preto e verde são os principais tipos de chá comercializados no mundo e em Moçambique o chá com maior índice de consumo é o chá preto.

No presente trabalho fez-se o estudo fitoquímico qualitativo e determinou-se o teor total de compostos fenólicos no chá preto nacional o *Socone Tea* e os importados, o *Five Roses* e *Green tea*, produzidos à partir da planta *C. sinensis*.

No estudo fitoquímico, para a obtenção dos extractos brutos os chás foram submetidos a extracção por Soxhlet com o sistema de solventes EtOH/H₂O (60:40). Os metabólitos secundários presentes nos extratos dos chás foram identificados através de testes qualitativos específicos de identificação descritos por Brito *et al.* (2008), Matos (1997) e Di Stasi (1995). O teor total de compostos fenólicos foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu descrito por El-Aal e Halaweish (2013).

Os resultados deste trabalho mostram que todas as amostras de chás analisados apresentam metabólitos secundários (tais como flavonóides, saponinas e taninos). Os ensaios quantitativos mostram que o chá preto importado *Five Rose*, tem maior teor de compostos fenólicos, com $101,73 \pm 5,44$ mg de equivalentes do ácido tânico por grama da amostra, o chá verde, *Green tea*, com $95,29 \pm 1,22$ mg de equivalentes do ácido tânico por grama da amostra e o chá preto nacional, o *Socone tea*, tem o menor teor de compostos fenólicos com $74,14 \pm 2,58$ mg de equivalentes do ácido tânico por grama da amostra.

ÍNDICE GERAL

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Declaração de Honra	iii
RESUMO	v
GLOSSÁRIO DAS ABREVIATURAS/SÍMBOLOS/SIGLAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJECTIVOS	2
2.1. Geral	2
2.2. Específicos	2
3. METODOLOGIA	3
3.1. Revisão bibliográfica.....	3
3.2. Amostragem.....	3
3.3. Análise laboratorial	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. Descrição e caracterização taxonómica de <i>Camellia sinensis</i>	4
4.2. Características botânicas de <i>C. sinensis</i>	4
4.3. Cultivo e propagação	5
4.4. Processamento do chá (<i>Camellia sinensis</i>) em estudo	6
4.4.1. Chá verde.....	6
4.4.2. Chá preto	6

4.5.	Composição fitoquímica de <i>C. sinensis</i>	8
4.5.1.	Compostos fenólicos.....	9
4.5.1.1.	Biossíntese dos compostos fenólicos (CF)	9
4.5.1.2.	Classificação dos compostos fenólicos (CF)	10
4.5.1.3.	Compostos fenólicos com maior ocorrência nos alimentos.....	11
4.5.1.4.	Extracção dos compostos fenólicos.....	15
4.5.1.5.	Análise de compostos fenólicos	16
4.5.2.	Outros metabólitos secundários da <i>C. sinensis</i>	18
4.5.2.1.	Terpenos	18
4.5.2.2.	Alcalóides	21
4.6.	Propriedades medicinais dos chás de <i>C. sinensis</i>	23
5.	PARTE EXPERIMENTA	24
5.1.	Obtenção das amostras	24
5.2.	Obtenção dos extractos das amostras	24
5.2.1.	Extracção por Soxhlet	24
5.2.2.	Extracção por infusão.....	26
5.3.	Ensaio qualitativos	27
5.3.1.	<i>Ensaio de identificação de flavonóides</i>	27
5.3.2.	<i>Ensaio de identificação de taninos e fenóis</i>	27
5.3.3.	<i>Ensaio de identificação de saponinas</i>	28
5.3.4.	<i>Ensaio de identificação das quinonas</i>	28
5.3.5.	<i>Ensaio de identificação de triterpenos e esteroides</i>	28
5.4.	Ensaio quantitativos	29

5.4.1.	Determinação de compostos fenólicos totais	29
5.4.1.1.	<i>Preparação do reagente de Folin – Ciocalteu</i>	29
5.4.1.2.	<i>Procedimento para a determinação do teor total de compostos fenólicos</i>	29
	<i>Preparação das soluções – padrão de ácido tânico</i>	30
6.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	31
6.1.	Resultados qualitativos e discussão	31
6.2.	Testes quantitativos e discussão	35
7.	CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES	37
7.1.	Conclusões	37
1.1.	Recomendações	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
	ANEXOS	44
	ANEXO A: Formulas usadas para cálculos	45
	ANEXO B: Tabela e gráfico de absorvância do padrão (ácido tânico)	46
	ANEXO C: Tabela de absorvância das amostras e seus teores totais de compostos fenólicos	47
	ANEXO D: Preparação das soluções	48
	ANEXO E: Material usado	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ilustrativa de <i>C. sinensis</i>	4
Figura 2. Imagem da paisagem em Gurùé.....	5
Figura 3. Etapas de processamento do chá preto e verde da <i>C. sinensis</i>	7
Figura 4. Esquema da biossíntese de CF a partir da fenilalanina	10
Figura 5. Estrutura básica dos flavonóides	12
Figura 6. Exemplos de flavonóides mais encontrados nos alimentos.....	13
Figura 7. Estrutura química dos polifenóis da classe das catequinas isoladas do chá verde.....	14
Figura 8. Dímeros das catequinas monoméricas	14
Figura 9. Exemplos de taninos encontrados nas folhas de <i>C. sinensis</i>	15
Figura 10. Estrutura básica dos terpenos (isopreno)	18
Figura 11. Exemplos de cada classe de terpenos	19
Figura 12. União da cabeça e cauda na obtenção do mirceno	20
Figura 13. Esquema de precursores de terpenos.....	21
Figura 14. Principais alcalóides do chá verde e preto.....	23
Figura 15. Fluxograma de sequência metodológica para a obtenção das fracções usadas para os testes fitoquímicos.....	25
Figura 16. Fluxograma da sequência metodológica para a determinação do teor total de CF.	26
Figura 17. Gráfico do teor de CF nos chás: Sc, 5R e GT.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição taxonómica	4
Tabela 2: Classificação dos CF.....	11
Tabela 3. Classificação dos terpenos	19
Tabela 4. Resumo de preparação das soluções – padrão de ácido tânico	30
Tabela 5. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos do chá <i>Socone</i> (chá de Gurùé).....	31
Tabela 6. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos do chá <i>Five Roses</i> (chá de RSA)	32
Tabela 7. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos do <i>Green tea</i> (chá da China)	33
Tabela 8. Teor total de compostos fenólicos em mg de equivalentes do ácido tânico	35

GLOSSÁRIO DAS ABREVIATURAS/SÍMBOLOS/SIGLAS

5R – Five Roses

Abs – Absorvância

Ac-Et – Acetato de etilo

C – Catequinas

CF – Compostos fenólicos

DCM –Diclorometano

EC – Epicatequina

EGC – Epigalocatequina

EGCG – Galato de epigalocatequina

EtOH – Etanol

GT – Green tea

HA – Hidroalcoólico

Hex – n-Hexano

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAL – Fenilalanina amónio lípase

RSD – Desvio padrão relativo

RSA – Republica Sul-Africana

s – Desvio padrão

Sc – Socone tea

TCF_{eq,AT} – Teor total de compostos fenólicos em equivalentes do ácido tânico

V – Volume

WHO –World Health Organization

\bar{X} – Média amostral

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) estima-se que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais com finalidades terapêuticas, sendo o chá obtido por infusão a forma mais usada, contribuindo assim para a prevenção e tratamento de doenças pela presença de compostos biologicamente activos como polifenóis (Schmitz et al. 2005; WHO, 1998).

A *Camellia sinensis* é cultivada em várias partes do mundo, onde toda a área cultivada cobre uma extensão de 2.600.000 ha, dos quais 2.000.000 ha pertencem á África. Em África a cultura foi introduzida pelos ingleses no século XIX e é feita no centro e este do continente dentre os quais citam-se países como: Quênia, Uganda, Ruanda, Burundi, Tanzânia, Zimbabwe, Malawi e Moçambique. Os maiores produtores do chá são a China, Vietname, Índia, Sri Lanka e Quênia (Garcia, 1961).

Nos últimos anos a cultura do chá tem registado grande incremento no Quênia, Uganda, Malawi e Moçambique. Em Moçambique, o chá é cultivado nas províncias da Zambézia e Manica. Actualmente a cultura do chá é amplamente desenvolvido no distrito de Gurùé, na província da Zambézia (Mahave, 2008).

Camellia sinensis é uma planta do tipo arbustiva pertencente à família das Theaceae podendo chegar a vários metros de altura. Nas zonas de cultivo para a produção do chá, o seu cultivo é feito preferencialmente por estacas que possibilitam maior uniformidade das plantas e maior produtividade (Schulz et al., 2002).

O chá produzido a partir da planta *C. sinensis* é uma cultura originária do sudeste asiático e é considerada a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água. O consumo de chá tem sido associado a muitos benefícios para a saúde e ao seu papel e mecanismo de quimio – prevenção do cancro. O chá preto, verde e oolong são os principais tipos de chá comercializados no Mundo (Camargo, 2011; Thangapazham, 2007).

No presente trabalho realizaram-se estudos fitoquímicos qualitativos e determinou-se o teor total de compostos fenólicos em alguns chás de *C. sinensis* comercializados na cidade de Maputo.

A análise fitoquímica refere-se à pesquisa dos princípios activos encontrados nos chás que são responsáveis pelas actividades biológicas. A quantificação dos compostos fenólicos refere-se à determinação do teor total de compostos fenólicos presentes em cada amostra de chá.

Este estudo é importante na medida em que contribui para fornecer informações sobre a composição fitoquímica e o teor total de compostos fenólicos, que são importantes no controlo de qualidade e na monitorização da legislação sobre os chás desta forma, esta pesquisa foi realizada com o intuito de fornecer informação sobre a composição química dos chás e os benefícios que estes possam contribuir na saúde dos consumidores.

2. OBJECTIVOS

2.1. Geral

- ✓ Avaliar o teor total de compostos fenólicos em diferentes amostras (marcas) de chá (*Camellia sinensis*) comercializadas em Maputo

2.2. Específicos

- ✓ Extrair compostos fenólicos em diferentes amostras (marcas) de chá comercializadas na cidade de Maputo
- ✓ Analisar qualitativamente as classes de compostos fenólicos presentes em diferentes amostras (marcas) de chá comercializadas na cidade Maputo
- ✓ Comparar o teor de compostos fenólicos totais em diferentes amostras (marcas) de chá comercializadas na cidade de Maputo

3. METODOLOGIA

Este trabalho teve como principais fases metodológicas: a) Revisão bibliográfica, b) Amostragem, c) Análise laboratorial.

3.1. Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica constitui numa primeira fase a selecção da literatura que aborda o assunto de modo a se ter uma visão geral sobre os estudos já realizados pelos outros autores. Com base na literatura existente foram sistematizadas as informações fitoquímicas e físico-químicas sobre o género e espécie *Camellia sinensis* em particular, o seu consumo em diferentes formas de chá no mundo e em particular em Moçambique, concretamente na cidade de Maputo, as principais classes de compostos por esta planta elaborados e disponíveis nos chás, suas respectivas actividades biológicas e farmacológicas, as técnicas de extracção e os testes de identificação.

3.2. Amostragem

Passado o processo teórico inicial do trabalho, seguiu-se a fase prática que teve como incidência a aquisição das amostras para análise laboratorial. As amostras de chá *Socone* (chá preto de Gurùe província da Zambézia – Moçambique) foram obtidas no dia 25/03/2014 no mercado de Xipamanine onde é comercializado avulso. O chá *Five Roses* (chá preto importado da África do Sul) e o *Green tea* (chá verde importado da China) foram adquiridos no supermercado Royal Group localizado na cidade de Maputo.

3.3. Análise laboratorial

A análise laboratorial, ou parte experimental, consistiu na extracção usando o aparelho de Soxhlet e por infusão, para a obtenção do extracto bruto. A partir dos extractos obtidos por Soxhlet, fez-se a identificação dos constituintes em análise, enquanto dos extratos obtidos por infusão determinou-se o teor total de compostos fenólicos, no laboratório de produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Descrição e caracterização taxonômica de *Camellia sinensis*



Figura 1. Imagem ilustrativa de *C. sinensis*

Fonte: <http://www.msstate.edu/org/arboretum/camsin.htm>: acessado em 21/04/2014

Tabela 1. Descrição taxonômica (Garcia, 1961)

Reino	<i>Plantae</i>
Subdivisão	<i>Fanerogâmica</i>
Classe	<i>Dicoteledônia</i>
Ordem	<i>Parietales</i>
Família	<i>Theaceae</i>
Gênero	<i>Camellia</i>
Espécie	<i>C. sinensis</i>

4.2. Características botânicas de *C. sinensis*

C. sinensis é um arbusto que cresce em inúmeras regiões com clima quente e húmido, pode atingir 15 metros de altura, mas que em cultura, se mantém sob a forma de arbusto. Tem uma raiz principal dominante, que pode atingir aproximadamente 1,70 m de profundidade, as raízes laterais podem desenvolver-se à superfície ou à mais profundidade conforme o meio em que a planta vive (Garcia, 1961; Scoparo, 2011).

C. sinensis é uma planta lenhosa nativa do sudeste da Ásia e Indonésia, possui folhas longas, de coloração verde-escuro, com nervuras bem marcadas nas superfícies e margens inteiramente denteadas. As folhas mais novas são cobertas por uma fina cobertura branca semelhante a uma penugem. As flores da planta são pequenas, geralmente com 4 a 5 pétalas brancas, possuindo muitos estames, são aromáticas e surgem nas axilas das folhas (Garcia, 1961; Scoparo, 2011).

4.3. Cultivo e propagação

O cultivo de *C. sinensis* deve ser feito num solo permeável, rico em matéria orgânica e bem irrigado, sob sol pleno. Para um bom desenvolvimento do chá é necessário um calor moderado, por isso têm sido plantadas nas regiões tropicais junto a montanhas e planaltos até 1600 metros de altitude (Schulz *et al.* 2002; Scoparo, 2011).

O plantio é feito por estacas que possibilita maior uniformidade das plantas e maior produtividade. O enraizamento é feito em sacos plásticos com areia adubada (Mahave, 2008).

Em todas as regiões, o cultivo é semelhante, utilizando-se árvores podadas, relativamente jovens, que são substituídas quando perdem a produtividade (Mahave, 2008).

Em Moçambique a cultura é feita na zona centro do país, em particular, nas zonas favoráveis de Milange, Gurùé, Tacuane e Socone, graças às condições de altitude e precipitação aí existentes (Mahave, 2008).



Figura 2. Imagem da paisagem em Gurùé

fonte: <http://milhasnauticas.blogspot.com/2012/04/cha-do-gurue.html>

4.4. Processamento do chá (*Camellia sinensis*) em estudo

O chá é a infusão de folhas ou botões da planta *C. sinensis*. Cada variedade ou tipo de chá tem um sabor específico de acordo com o processamento utilizado (Lin *et al*, 1998).

De um modo geral, o chá pode ser classificado em três categorias: O chá verde (não fermentado), o chá oolong (semi – fermentado) e o chá preto, vermelho (totalmente fermentado), segundo Lin *et al* (1998).

4.4.1. Chá verde

O chá verde é obtido pelo processo não fermentativo, onde ocorre uma simples secagem e estabilização das folhas pela inativação da enzima polifenoloxidase. Este processo permite a conservação de quase todo o conteúdo original de polifenóis, a coloração verde e torna as folhas flexíveis e maleáveis. As folhas são enroladas e colocadas em bandejas aquecidas, para romper a estrutura celular. De seguida as folhas são secas até que retenham apenas 2% da humidade original (Camargo, 2011; Scoparo, 2011).

4.4.2. Chá preto

O chá preto é obtido pelo processo de fermentação completa dos polifenóis pela enzima polifenoloxidase que resulta em dímeros e polímeros, que conferem a cor e sabor específico do produto. A obtenção do chá preto obedece os seguintes processos.

- Murchamento – As folhas são submetidas á circulação de ar quente provocando a evaporação da água o que leva á diminuição da humidade até cerca de 55% a 65%. Neste processo as folhas são estendidas em camadas finas em tabuleiros sobre redes metálicas através dos quais se faz passar ar quente a uma temperatura controlada. Este processo dura cerca de 18 à 24 horas.
- Enrolamento – Este processo consiste em enrolar as folhas, o que permite o contacto entre os polifenóis com as enzimas oxidase e o oxigénio. Este processo dura cerca de 30 minutos, mas pode ser repetido pois se o chá não for suficientemente enrolado origina infusões fracas.

- Fermentação – O processo de fermentação começa com o início do enrolamento. Neste processo, as folhas são colocadas em camadas de altura que varia de 2 à 8 cm sobre uma superfície de cimento ou alumínio. A fermentação exige a presença de oxigénio, uma atmosfera com muita humidade e uma temperatura abaixo de 30°C. Dependendo do equipamento usado a fermentação pode durar entre 2 à 3 horas.
- Secagem – A fermentação termina com a secagem. A duração desta operação depende da humidade das folhas fermentadas, geralmente dura aproximadamente 20 minutos, a 90°C. De um modo geral este processo faz-se passando os tabuleiros num dissecador de ar quente.
- Selecção – Depois de arrefecidas, as folhas são separadas de acordo com o tamanho das partículas. Esta separação é efectuada em pratos oscilantes, associados a máquinas que quebram as folhas e outras que aspiram poeiras e corpos estranhos. A selecção das folhas dá origem a diferentes tipos ou graus de chá preto.

As etapas de produção do chá verde e preto estão descritas de uma forma resumida na figura 3.

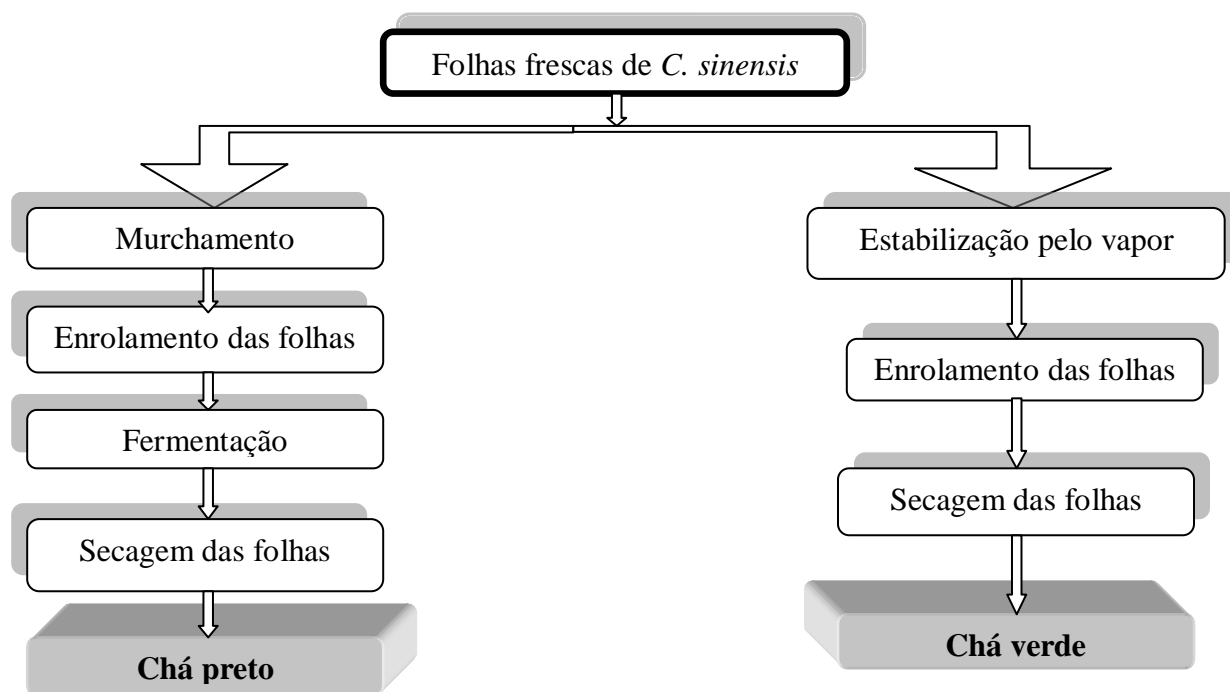


Figura 3. Etapas de processamento do chá preto e verde da *C. sinensis* (Hilal e Engelhardt, 2007)

4.5. Composição fitoquímica de *C. sinensis*

Segundo Camargo (2011) a composição química do chá (*C. sinensis*) pode ser influenciada significativamente por vários factores como época da colheita, idade da folha, variedade do chá, clima, solo e técnicas de cultivo (irrigação e uso de fertilizantes). Devido a esta variedade não existe uma composição exacta das infusões (Balentine *et al*, 1998). Outro factor que influencia na composição das infusões (chá) é o modo de preparação, onde os principais factores incidentes são a temperatura e o tempo. Para garantir maior extracção dos constituintes recomenda-se preparar as infusões com água à 100°C durante 5 minutos. O aumento do tempo não tem repercussão significativa nos níveis de compostos encontrados na infusão final (Khokhar & Magnusdottir, 2002; Friedman *et al*, 2005).

Os componentes químicos dos chás têm sido amplamente investigados e os estudos realizados mostram que a composição dos chás é bem variada, destacando-se os polifenóis (flavonóides), alcalóides (cafeína, teofilina e teobromina), óleos essenciais, polissacarídeos, aminoácidos, lípidos, vitaminas, elementos inorgânicos, entre outros, sendo que muitos dos efeitos benéficos dos chás são atribuídos aos compostos fenólicos (Camargo, 2011).

Os polifenóis são os componentes da folha de *Camellia sinensis* que se encontram em doses mais elevadas podendo atingir cerca de 30% do peso seco da folha. Estes compostos são também os mais importantes e característicos da folha de *Camellia sinensis*, porque são os principais intervenientes nas alterações químicas que ocorrem no processamento do chá de *C. sinensis*. É de estes que se originam uma série de outros compostos importantes para as características do produto final e também da bebida a consumir-se. A maior parte dos polifenóis identificados nas folhas de *Camellia sinensis* são pertencentes ao grupo de flavonóides concretamente aos flavanóis ou catequinas, são também os compostos que são oxidados ou não nos vários tipos de processamento de chá (Camargo, 2011).

4.5.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (CF) constituem uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas, onde desempenham diversas funções fisiológicas. Entre outras funções, os compostos fenólicos intervêm no crescimento e reprodução das plantas, protegem contra organismos patogênicos, predadores e a radiação ultravioleta. Também contribuem nas características organolépticas dos alimentos de origem vegetal (Martinez – Valverde *et al*, 2000; Balasundram *et al*, 2006).

Aos compostos fenólicos são atribuídas varias actividades biológicas, onde se destacam os efeitos vasodilatadores, anti-inflamatório, anti-alérgico, anti-viral, bactericida, estimuladores da imunidade e antioxidante (Balasundram *et al*, 2006).

Os compostos fenólicos possuem no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos hidroxílicos (Lee *et al*, 2005). Os compostos fenólicos com maior ocorrência nas plantas apresentam-se em forma de glicosídeos e podem também ocorrer na forma esterificada. São facilmente oxidáveis por enzimas vegetais específicas, metais, luz, calor ou também por um meio alcalino, existem cerca de 8000 diferentes compostos fenólicos conhecidos (Simões *et al*, 2004).

Nas plantas os compostos fenólicos são biossintetizados por duas rotas a primeira e a mais importante é a rota do ácido chiquímico, que participa na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos vegetais e a rota do ácido malónico, com menor importância na biossíntese de compostos fenólicos nas plantas.

4.5.1.1. Biossíntese dos compostos fenólicos (CF)

A biossíntese dos CF nas plantas é feita principalmente pela rota do ácido chiquímico que consiste em converter carboidratos derivados da glicólise e da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos. Um dos intermediários dessa rota é o ácido chiquímico, e a enzima mais importante neste processo é a fenilalanina amónio lípase (PAL) que produz o ácido cinâmico. As classes mais abundantes dos CF encontrados nos vegetais são derivados da fenilalanina como mostra o esquema da figura 9 (Taiz; Zieger, 2004).

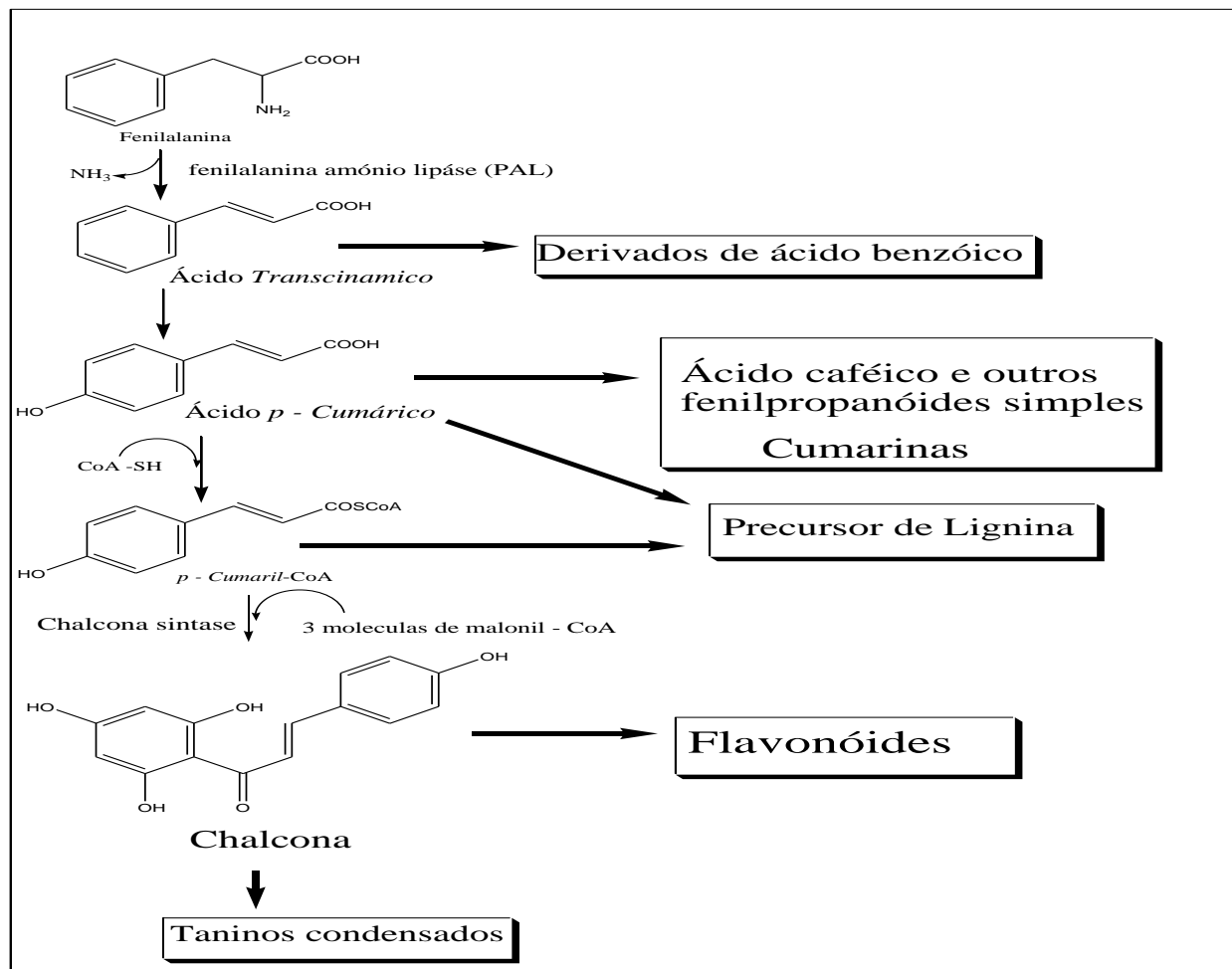


Figura 4. Esquema da biossíntese de CF a partir da fenilalanina (Taiz e Zeiger, 2004)

4.5.1.2. Classificação dos compostos fenólicos (CF)

A natureza dos polifenóis varia desde moléculas simples até aos altamente polimerizados. Os CF são classificados de acordo com o seu esqueleto principal como mostra a tabela 3.

Tabela 2: Classificação dos CF (Balasundram *et al*, 2006)

Esqueleto básico	Classe dos CF
C_6	Fenóis simples e benzoquinonas
$C_6 - C_1$	Ácidos fenólicos
$C_6 - C_2$	Ácidos fenilacéticos e acetofenonas
$C_6 - C_3$	Fenilpropanoides (ácidos cinâmicos e análogos) e fenilpropenos (cumarinas, isocumarinas e cromonas)
$C_6 - C_4$	Naftaquinonas
$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas e benzofenonas
$C_6 - C_2 - C_6$	Antraquinonas e estilbenos
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides, isoflavonoides e chalconas
$(C_6 - C_3)_2$	Lignanos e neolignanos
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Diflavonoides
$(C_6 - C_3)_n$	Ligninas
$(C_6 - C_1)_n$	Taninos hidrossolúveis
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos condensados

De acordo com Balasundram *et al* (2006) os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são considerados como as classes dos CF com maior importância na dieta humana. Segundo a literatura, nos chás da planta *C. sinensis* (chá verde e preto) as classes dos CF mais encontradas são os flavonóides e taninos (Wang *et al*, 2000; Cavalcanti *et al*, 2010)

4.5.1.3. Compostos fenólicos com maior ocorrência nos alimentos

Flavonóides

Os flavonóides constituem a classe dos CF com maior distribuição nas plantas. São polifenóis que ocorrem em alimentos de origem vegetal e são comuns na dieta humana. São muito encontrados nas plantas superiores, onde são responsáveis pela coloração das flores e dos frutos (Simões *et al*, 2004).

São compostos aromáticos de baixo peso molecular, constituídos por quinze átomos de carbono no seu esqueleto básico, arranjados em uma configuração C₆ – C₃ – C₆ onde os anéis C₆ são aromáticos. Os anéis (A e B) são ligados por uma ponte de três carbonos formando um anel heterocíclico oxigenado conforme mostra a figura 10 (Rice – Evans, 2004; Manach, *et al*, 2004).

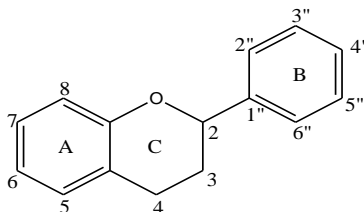


Figura 5. Estrutura básica dos flavonóides

Dependendo da substituição e o grau de oxidação do anel C os flavonóides podem ser divididos em 14 subclasses, sendo os que se incluem na dieta humana divididos essencialmente em 6 grupos (Birt *et al*, 2001):

- Flavanóis (catequina): contêm apenas um hidroxilo no carbono-3, porém sem a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel C;
- Flavonóis (quercetina e kaempferol): contêm um hidroxilo na posição três e carbonilo na posição quatro do anel “C”;
- Flavanonas (hesperetina): contêm apenas a função carbonilo no carbono-4, também sem a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel “C”;
- Flavonas (apigenina, diosmetina): contêm a função carbonilo na posição quatro do anel “C” e a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel “C”;
- Antocianidinas (cianidina): contêm apenas um hidróxilo no carbono-3 do anel “C”;
- Isoflavonas (genisteína, daidzeina): o anel “B” está localizado na posição carbono-3 do anel “C”.

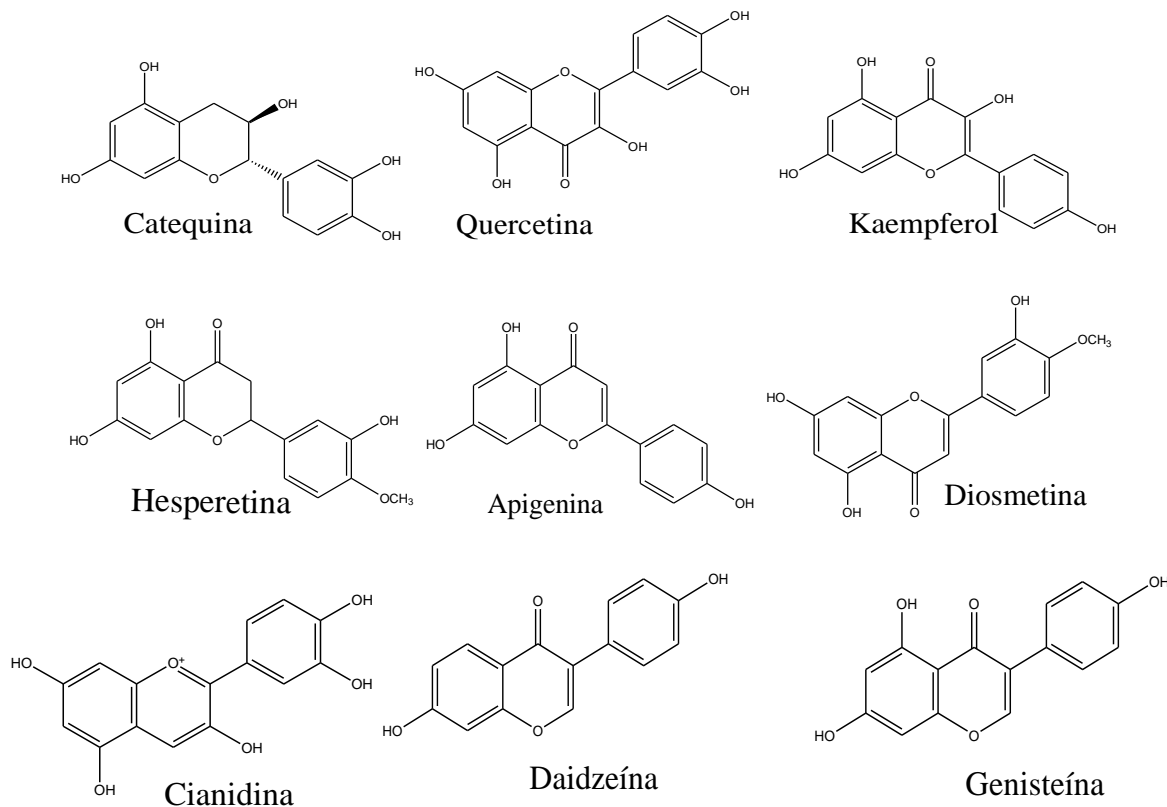
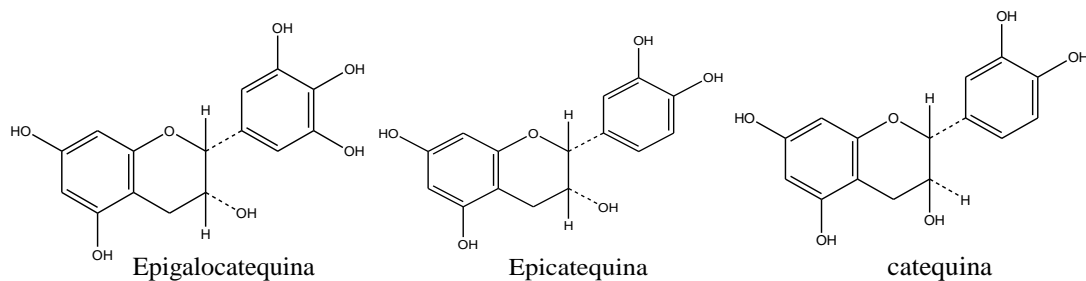


Figura 6. Exemplos de flavonóides mais encontrados nos alimentos

Flavonóides nos chás de *C. sinensis*

No chá verde cerca de 90% do teor total de flavonoides pertence as catequinas e 10% ao grupo de Flavonóis segundo, Rijken *et al*, (1996) citado por Peterson & Dwyer (1998). Segundo Peterson & Dwyer (1998) nas catequinas contidas no chá verde destacam-se galato de epigalocatequina (EGCG) com maior percentagem, epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC) e traços de catequinas (C).



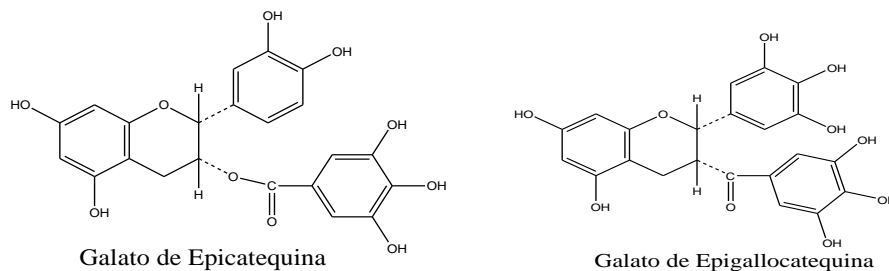


Figura 7. Estrutura química dos polifenóis da classe das catequinas isoladas do chá verde (Peterson & Dwyer, 1998).

O chá preto apresenta na sua composição uma mistura complexa de dímeros e polímeros de catequinas monoméricas constituída de teaflavinas, teasinesinas e tearubiginas (Figura 13) gerada pela oxidação enzimática das catequinas (Haslam, 2003).

As teaflavinas e teasinesinas são os principais produtos oxidados do chá preto apresentando-se em maior quantidade, além das tearubiginas (Tanaka, 2003). As teaflavinas dão coloração e brilho vermelho – laranja, sendo produzidas a partir da condensação oxidativa entre EC e EGC ou EGCG (Hashimoto, 1998). As tearubiginas possuem estruturas complexas e heterogêneas ainda não completamente elucidadas, monoméricas ou poliméricas, tem como principais precursores EGC e EGCG (Haslam, 2003).

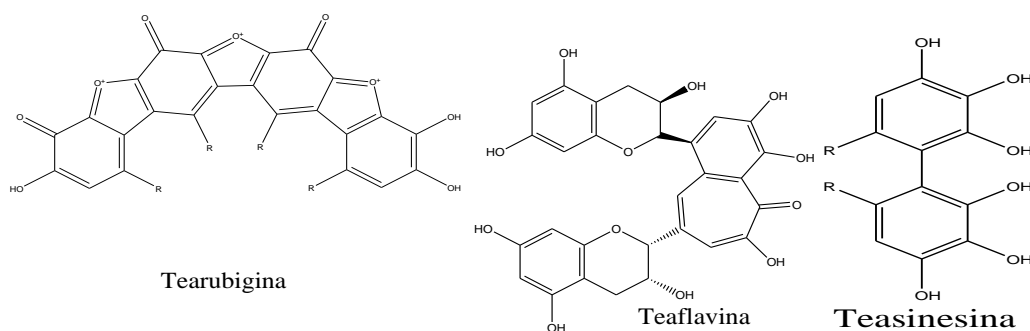


Figura 8. Dímeros das catequinas monoméricas (Haslam, 2003).

Taninos

Outros CF presentes no chá verde em maior quantidade que no chá preto são os taninos. Segundo a sua estrutura os taninos podem ser classificados em dois grupos, os hidrolisáveis e os condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos elágicos e ácidos gálicos

glicosilados, como por exemplo a strictinina (**A**) e os taninos condensados são polímeros de flavanóis (**B** e **C**) (Cavalcanti *et al*, 2010).

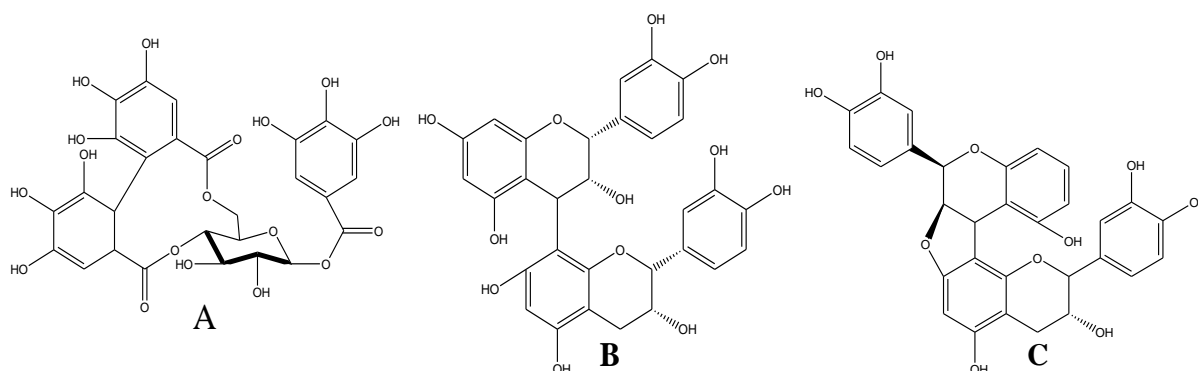


Figura 9. Exemplos de taninos encontrados nas folhas de *C. sinensis* (Heldt, 1997)

4.5.1.4. Extração dos compostos fenólicos

A extração de CF em matéria-prima vegetal é influenciada pela natureza química desses compostos, pelo método de extração usado, pelo tamanho das partículas da amostra, pelo tempo de armazenamento e condições, bem como pela presença de substâncias interferentes (Naczk e Shahidi, 2004).

A solubilidade dos CF é determinada pela sua natureza química na planta, que pode variar de substâncias simples até altamente polimerizadas. Há possibilidade de interação entre os CF e outros constituintes da planta, como carboidratos e proteínas. Esta interação pode levar à formação de complexos que podem ser quase insolúveis. A solubilidade dos CF é também afectada pela polaridade dos solventes utilizados. Sendo assim torna-se difícil desenvolver um procedimento de extração apropriado para a extração de todos os CF (Naczk e Shahidi, 2004). Solventes como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo, e suas combinações, frequentemente com diferentes proporções de água, têm sido utilizados para a extração de CF, segundo Antolovich *et al* (2000).

O tempo de extração e factores relacionados também influenciam na extração dos CF na matéria-prima vegetal. Prolongados tempos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos CF Além disso, a razão amostra/solvente também influencia directamente na extração dos CF nas plantas (Naczk e Shahidi, 2006).

Extracção por Soxhlet

A extracção por Soxhlet é um método muito utilizado na extracção de compostos orgânicos, é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação. Este método apresenta restrições ligadas ao prolongado tempo de extracção, que pode variar de 1 hora à 24 horas (Miguel e Andrade, 1989). Neste processo, o solvente extrai a matéria orgânica presente no material vegetal e o material extraído permanece em contacto com o solvente em ebulição durante todo o procedimento e, em alguns casos, isto pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos segundo Melecchi (2005).

A extracção com o Soxhlet apresenta como vantagens, a renovação do solvente durante o processo, o que aumenta o coeficiente de partição e a eficiência da extracção; não necessita de filtração, o que simplifica o tempo de manuseio do extracto depois da extracção e reduz os riscos de perda e/ou contaminação do extracto e apresenta uma maior reprodutibilidade (Luque – García e Castro, 2003).

Extracção por infusão

Consiste na extração, pela permanência, durante certo tempo, do material vegetal em água fervente, em recipiente fechado. É aplicável a partes vegetais de estrutura mole, as quais devem ser contundidas, cortadas ou pulverizadas grosseiramente, conforme sua natureza, a fim de que possa ser mais facilmente penetradas e extraídas pela água (Melecchi 2005).

Vantagens: o aquecimento torna o processo de extração mais rápido e mais eficiente, uma vez que aumenta a solubilidade de alguns princípios activos, têm como principais desvantagens a perda de princípios activos voláteis e tremoláveis (Antolovich *et al*, 2000).

4.5.1.5. Análise de compostos fenólicos

Diferentes métodos de análise de CF têm sido publicados. No entanto, a estratégia analítica apropriada para o estudo de CF bioactivos em vegetais depende do propósito do estudo bem como da natureza da amostra. Segundo Robards (2003), os métodos utilizados para a análise de CF podem ser classificados como aqueles que determinam grupos específicos ou classe de CF bem como aqueles que quantificam o conteúdo total de CF

Para os testes de identificação de metabólitos secundários foi usada a metodologia descrita por Matos (1997), Di Stasi (1995) e Brito *et al.* (2008).

Análise quantitativa dos compostos fenólicos

Assim como a extração, a quantificação dos CF também é influenciada pela natureza química dos compostos, método de extração empregado, tamanho das partículas das amostras, tempo e condições de armazenagem, bem como o método de análise, selecção de padrões e presença de substâncias interferentes (Naczk e Shahidi, 2006).

Vários métodos espectrofotométricos para a quantificação dos CF têm sido desenvolvidos. O método de Folin – Denis é um dos mais utilizados para a quantificação dos CF totais em vegetais (Naczk e Shahidi, 2004). Este método foi descrito por Swain e Hills (1959) citado por Ângelo e Jorge (2007), baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico – fosfotúngstico pelos grupos hidroxilos fenólicos, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reacção ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O método Folin – Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os CF presentes, além de substâncias redutoras adicionadas nos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados (Ângelo e Jorge, 2007).

Muitas vezes o reagente de Folin – Denis é substituído pelo reagente de Folin – Ciocalteu. Este último é mais sensível á redução pelos fenóis e diminui a tendência de precipitação. As principais diferenças entre estes dois reagentes é o uso de sulfato de lítio, a presença do ácido clorídrico e o longo tempo de aquecimento para a preparação do reagente de Folin – Ciocalteu (Ângelo e Jorge, 2007). Para ambos os testes, o número de grupos hidroxilos ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. Os grupos fenólicos devem estar na forma de fenolatos para os aniões fosfomolibdicos e túngsticos produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas decompõem-se vagorosamente em pH alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato (Shahidi e Naczk, 1995). Este método espectrofotométrico, independente do reagente utilizado, Folin – Denis ou Folin – Ciocalteu, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extracto, incluindo as proteínas extraíveis (Naczk e Shahidi, 2004).

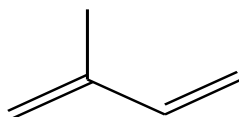
4.5.2. Outros metabólitos secundários da *C. sinensis*

Os compostos fitoquímicos resultantes do metabolismo primário, têm uma distribuição universal nas plantas variando apenas as quantidades de acordo com a espécie e outros factores externos. Os principais metabólitos primários são: aminoácidos, nucleótidos, lípidos, carboidratos e a clorofila (Simões *et al.*, 2004)

O metabolismo secundário origina compostos que não apresentam uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas. Esses metabólitos desempenham um papel importante na interacção das plantas com o meio ambiente. As principais classes de metabólitos são: terpenos, alcalóides e os compostos fenólicos ou polifenóis (Simões *et al.* 2004).

4.5.2.1. Terpenos

São compostos de origem vegetal possuindo uma ou mais ligações duplas, muitas vezes de estrutura cíclica. Os terpenos estão relacionados entre si apesar da sua grande diferença estrutural. O nome terpeno deriva da terebentina (turpentine) de onde foram isolados a cânfora e o α -pineno. A unidade base dos terpenos é o isopreno (2 – metil – 1,3 – butadieno) que contem 5 átomos de carbono na sua estrutura (Mann, 1993).



Isopreno

Figura 10. Estrutura básica dos terpenos (isopreno)

Os terpenos encontram-se no reino vegetal, são habitualmente os principais constituintes odoríferos chamados de óleos essenciais. Os derivados de terpenos constituem um grupo de compostos que ocorrem nas plantas e que têm em comum o facto de serem derivados do isopreno (Mann, 1993).

A classificação dos terpenos é feita de acordo com a quantidade de unidades de isopreno: hemiterpenóides (C5); monoterpenóides (C10); sesquiterpenóides (C15); diterpenóides (C20); triterpenóides (C30); e carotenóides (C40) segundo Peres (2008).

Tabela 3. Classificação dos terpenos

Terpenos	Fórmula geral	Número (unidades)
Monoterpenos	$C_{10}H_{16}$	2
Sesquiterpenos	$C_{15}H_{24}$	3
Diterpenos	$C_{20}H_{32}$	4
Triterpenos	$C_{30}H_{48}$	6
Tetraterpenos	$C_{40}H_{64}$	8
Poli-terpenos	$(C_5H_8)_n$	$n > 8$

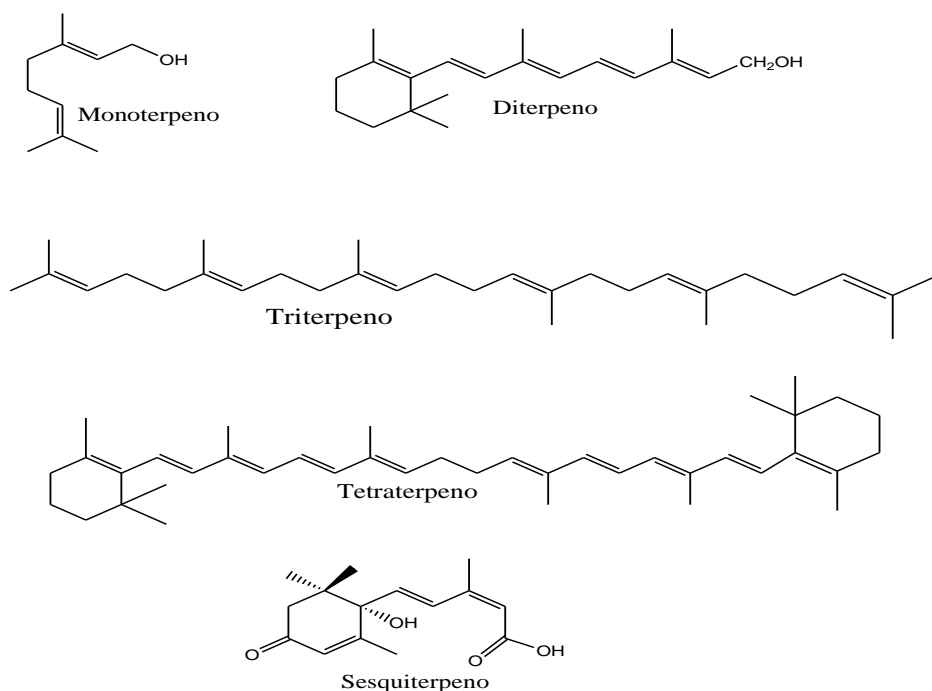


Figura 11. Exemplos de cada classe de terpenos (Scoparo, 2011).

Na unidade isoprénica podemos encontrar uma parte a qual designamos de *cabeça* e outra por *cauda*.

De acordo com a regra do isopreno os terpenos podem ser considerados como resultantes da união da cabeça com a cauda da unidade do isopreno. A figura 6 mostra como os terpenos podem apresentar esta reacção, cabeça e cauda, no caso do mirceno (Lobo, 1976).

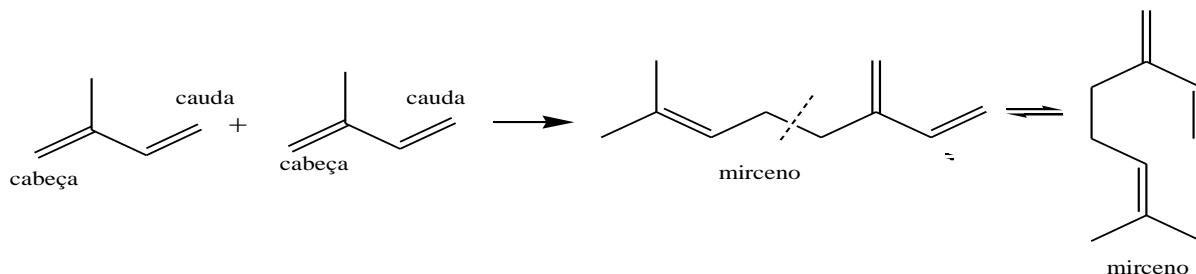


Figura 12. União da cabeça e cauda na obtenção do mirceno

Biossíntese dos terpenos

O precursor dos terpenos é o ácido mevalónico, que é produzido a partir do acetil coenzima A. O isopreno não é o precursor biológico dos terpenos. A natureza utiliza dois equivalentes de isopreno o pirofosfato de isopentinilo e o pirofosfato de dimetil-alilo. Estas moléculas com 5 átomos de carbono são sintetizadas a partir de três unidades de acetil CoA (Lobo, 1976).

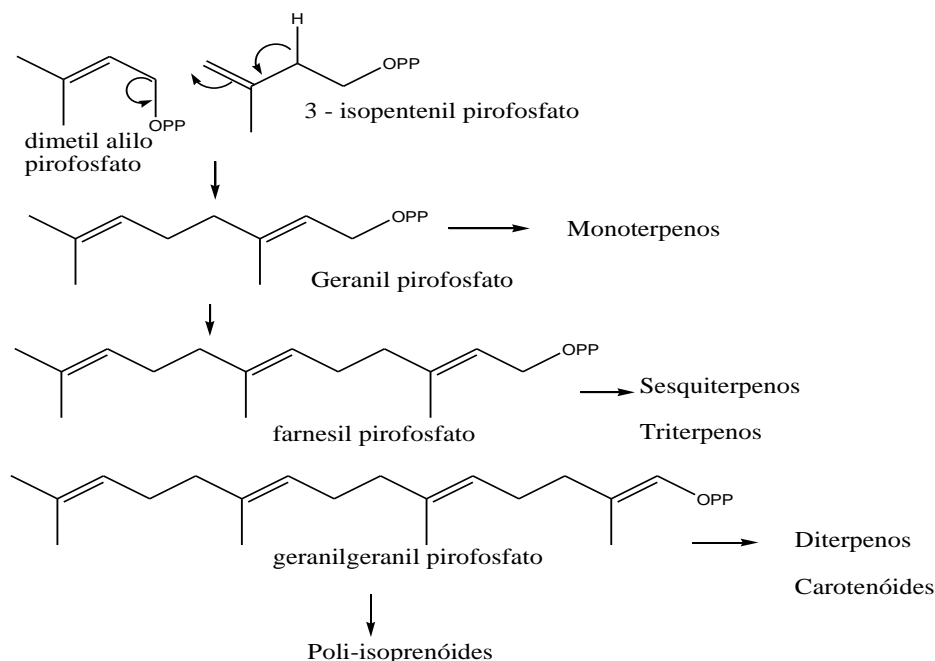


Figura 13. Esquema de precursores de terpenos

A comparação realizada por *Schuh e Schieberle* (2006), dos terpenos voláteis (monoterpenos) presentes em infusões preparadas com o chá verde e o chá preto indicou que a infusão do chá verde tinha no total 42 compostos, enquanto para o chá preto, apenas 24, deste modo, no processamento da infusão para o consumo uma grande quantidade de compostos voláteis é perdida.

Outro grupo de terpenóides encontrados nas plantas são as saponinas, constituídas por um núcleo triterpenóide pentacíclico, onde se encontram ligados mono ou/e oligossacarídeo. Diversas saponinas foram isoladas da planta *Camellia sinensis* (*Matsuy et al*, 2009)

4.5.2.2. Alcalóides

Originalmente o nome alcalóide (de *álcali-* que significa básico, com o sufixo - *oide*, "semelhante a") foi dado a todas as bases orgânicas isoladas de plantas. Esta definição cobre uma larga variedade de compostos. Tem que se admitir que até hoje não existe uma definição para o termo "alcalóide" que seja completamente satisfatória, mas segundo *Pelletier* (1882) citado por

Morrison e Boyd, (2005), alcalóides são moléculas cíclicas que contêm nitrogénio endocíclico e que são verdadeiros metabólitos secundários produzidos pelos seres vivos”. Esta definição exclui as aminas simples, os derivados de amoníaco acíclicos e ainda os compostos nitro e nitrosos (uma vez que nos alcalóides o átomo de nitrogénio tem de possuir estado de oxidação negativo).

Os alcalóides formam um grupo muito vasto de metabólitos que podem ocorrer tanto em microorganismos como em plantas superiores e inferiores ou ainda em animais, apesar de nestes últimos ocorrerem com menor frequência (Harborne, 1998).

Classificação

Ainda não existe um sistema rígido de classificação de alcalóides. É possível adoptar uma classificação que está baseada nos princípios biossintéticos, natureza do anel heterocíclico a que pertencem e as espécies de planta das quais uma classe de alcalóides foi isolada (Milcent, 2003).

Os alcalóides podem ser classificados de acordo com a classificação de Hegnauer como alcalóides verdadeiros, protoalcalóides e pseudoalcalóides (Milcent, 2003; Harborne, 1998)

- *Alcalóides verdadeiros* são os de maior número na natureza, a biossíntese deles deriva de aminoácidos. Pode-se considerar diferentes subdivisões consoante o aminoácido precursor (Exemplo: alcalóides morfina e codeína derivados de fenilalanina; alcalóides cocaína e atropina derivados da ornitina).
- *Protoalcalóides* são aminas simples, onde o átomo de nitrogénio não faz parte de um anel heterocíclico. Eles derivam de aminoácidos e são chamados frequentemente “aminas biológicas” (Exemplo: hordenina, efedrina).
- *Pseudoalcalóides* são derivados de terpenos ou esteróides e não de aminoácidos. Nesta classe pertence certo número de compostos terpénicos e esteróides, derivados metilados de purinas (Exemplo: cafeína, solanidina).

De acordo com a natureza do anel heterocíclico a que pertencem podem ser classificados como alcalóides do grupo pirrolidina, piperidina, piridina, isoquinolina, quinolina, esteroidais, diterpenos, purinas, etc. Uma outra classificação dos alcalóides pode ser feita de acordo com a fonte botânica em que o alcalóide ou grupo de alcalóides foi isolado, então podemos ter: alcalóides de tabaco, alcalóides de quina, alcalóides de cinchona, etc.

Os principais alcalóides de purinas presentes no chá verde e preto são teofelina, teobromina e cafeína (Del Rio *et al*, 2004).

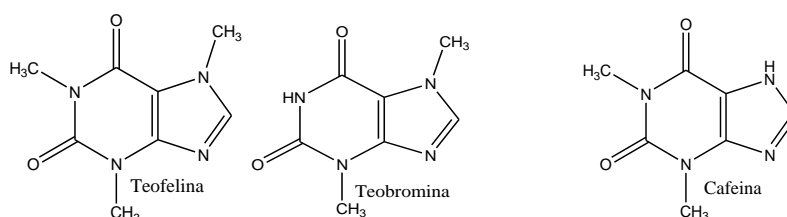


Figura 14. Principais alcalóides do chá verde e preto

4.6. Propriedades medicinais dos chás de *C. sinensis*

A polimerização das catequinas ocorrida na produção do chá preto não afecta de forma significativa a sua actividade biológicas uma vez que as teaflavinas formadas no chá preto e catequinas do chá verde possuem actividades biológica similares (Leung *et al*, 2001).

A literatura tem demonstrado constantemente o potencial papel dos chás da *C. sinensis* na modulação de processos antioxidantes, antiinflamatórios, antitumorais, antiaterogénicos, hipoglicemiantes e no controle do peso (Senger *et al*, 2010).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Obtenção das amostras

As amostras de chá *Socone* (chá preto de Gurúé província da Zambézia – Moçambique) foram adquiridas no dia 20/03/2014 no mercado de Xipamanine, onde é comercializado avulso, depois foram transportadas para o laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química onde foram acondicionadas em uma prateleira ao abrigo da luz até a realização dos testes.

O chá *Five Roses* (chá preto importado da África do Sul) e o *Green tea* (chá verde importado da China) foram adquiridos no dia 25/03/2014 no supermercado *Royal Group* localizado na cidade de Maputo, depois foram transportados para o laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química até a realização dos testes.

5.2. Obtenção dos extractos das amostras

5.2.1. Extracção por Soxhlet

Pesou-se com ajuda de uma balança técnica 5,00g de cada amostra de chá, onde colocou-se em cartuchos e submetidos à extracção por Soxhlet com 200mL do sistema de solventes constituído por EtOH – H₂O 60/40 (%v/v) por cerca de 2 horas.

Após a extracção com Soxhlet seguiu-se a remoção do solvente do extracto bruto à pressão reduzida com ajuda do vaporizador rotativo.

Por partição em solventes, procedeu-se à separação das fracções apolares e polares obedecendo a seguinte sequência: n – hexano, diclorometano e acetato de etilo, cada fracção foi submetida a testes fitoquímicos para identificação de possíveis classes de metabólitos existentes na amostra.

A figura 15 mostra de uma forma resumida o fluxograma dos procedimentos supracitados.

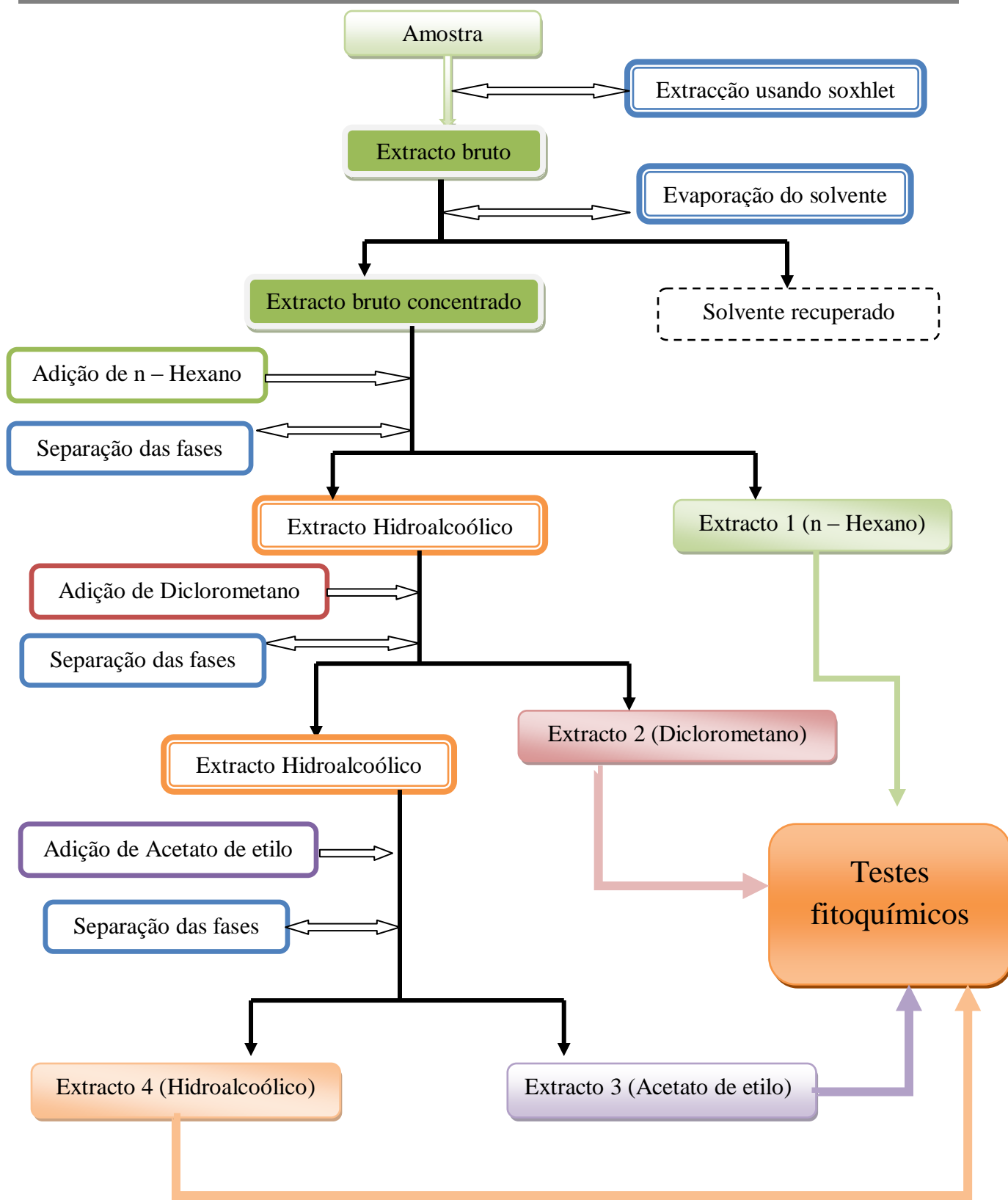


Figura 15. Fluxograma de sequência metodológica para a obtenção das fracções usadas para os testes fitoquímicos

5.2.2. Extracção por infusão

Pesou-se com ajuda de uma balança analítica 1,00g de cada amostra de chá, colocou-se num balão com 100 mL de água fervente por cerca de 5 minutos, deixou-se arrefecer e filtrou-se com papel de filtro número 1. Os extractos obtidos foram colocados em prateleiras ao abrigo da luz, para a quantificação do teor total dos compostos fenólicos.

A figura 16 mostra de uma forma resumida o fluxograma dos procedimentos supracitados.

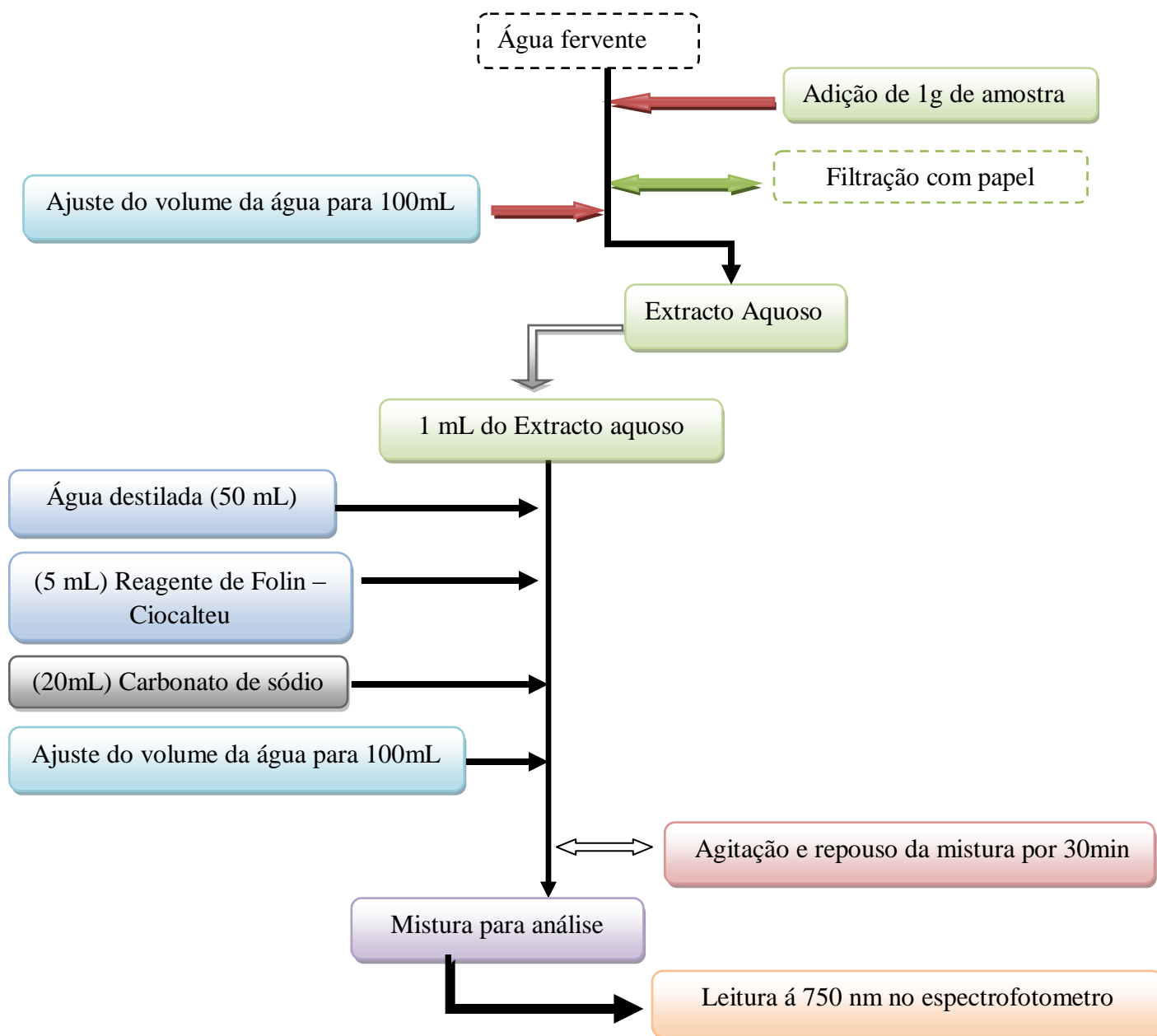


Figura 16. Fluxograma da sequência metodológica para a determinação do teor total de CF.

5.3. Ensaio qualitativo

Os extractos brutos obtidos da extracção pelo Soxhlet foram submetidos aos ensaios qualitativos para a identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes em cada amostra.

Para os testes qualitativos foi usada a metodologia descrita por Matos (1997); Di Stasi (1995) e por Brito *et al.* (2008).

5.3.1. Ensaio de identificação de flavonóides

Teste de cianidina ou de Schinoda

O procedimento deste teste consistiu na adição de aproximadamente 1 cm de fita de magnésio e 2 mL ácido clorídrico concentrado a 2mL de extracto num tubo de ensaio. O fim da reacção deu-se pelo término da efervescência.

Teste de cloreto férrico $FeCl_3$

O procedimento deste teste consistiu na adição de aproximadamente 1 mL da solução de cloreto férrico num tubo de ensaio com 1mL de extracto.

Teste do meio alcalino

O teste do meio alcalino consistiu na alcalinização de 1 mL de extracto num tubo de ensaio adicionando cerca de 1 mL de hidróxido de sódio.

Teste do meio ácido

O teste do meio ácido consistiu na acidulação de 1 mL de extracto num tubo de ensaio adicionando cerca de 1 mL de ácido sulfúrico.

5.3.2. Ensaio de identificação de taninos e fenóis

Teste de cloreto férrico

O teste de cloreto férrico consistiu em adicionar cerca de 2 mL do extracto num tubo de ensaio e, de seguida, a adição de algumas gotas de cloreto férrico, com agitação forte.

Teste de acetato de chumbo

O teste de acetato de chumbo consistiu em adicionar cerca de 2 mL de extracto num tubo de ensaio e, de seguida, adição de 3 gotas de acetato de chumbo.

5.3.3. Ensaio de identificação de saponinas

Teste de espuma

Para a identificação das saponinas procedeu-se da seguinte maneira: num tubo de ensaio com cerca de 1 mL de extracto adicionou-se 1 mL de clorofórmio, 2,5 mL de água destilada e logo após filtrou-se para um outro tubo de ensaio. Em seguida agitou-se permanentemente por cerca de 3 minutos.

5.3.4. Ensaio de identificação das quinonas

Para a identificação das quinonas procedeu-se da seguinte maneira: num tubo de ensaio com cerca de 1 mL de extracto adicionou-se 2 mL de clorofórmio e logo após recolheu-se a fase clorofórmica para outro tubo de ensaio. Em seguida adicionou-se 3 gotas de hidróxido de sódio na fase clorofórmica.

5.3.5. Ensaio de identificação de triterpenos e esteroides

Para a identificação de triterpenos e esteróides procedeu-se da seguinte maneira: num tubo de ensaio evaporou-se até à secura cerca de 2mL de extracto em banho-maria. Dissolveu-se o resíduo com adição de cerca de 3mL de clorofórmio com agitação leve. Em seguida transferiu-se a fase clorofórmica para outro tubo de ensaio e adicionou-se cerca de 1 mL de anidrido acético. Posteriormente, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico pelas paredes do tubo.

5.4. Ensaio quantitativo

Os extractos obtidos por infusão foram submetidos aos ensaios quantitativos para a quantificação dos compostos fenólicos totais.

Usou-se extractos aquosos para ensaios quantitativos com a intenção de quantificar o teor de compostos fenólicos administrados com a ingestão de uma chávena de chá com 100mL de capacidade.

5.4.1. Determinação de compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais usou-se o método de Folin – Ciocalteu descrito por El-Aal e Halaweish (2013).

5.4.1.1. Preparação do reagente de Folin – Ciocalteu

A preparação do reagente de Folin – Ciocalteu seguiu o procedimento publicado nas comunicações da Comissão Europeia (2010).

Num balão dissolveu-se 100g de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 25g de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 700mL de água destilada. Juntou-se á mistura 50mL de ácido fosfórico à 85% e 100mL de ácido clorídrico concentrado. Levou-se à ebulição, mantendo-se sob refluxo durante 10 horas. Juntou-se em seguida 150g de sulfato de lítio ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e levou-se de novo à ebulição durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer e adicionou-se água ate completar o volume de 1 litro.

5.4.1.2. Procedimento para a determinação do teor total de compostos fenólicos

Num balão de 100 mL colocou-se 1mL do extracto aquoso, 50 mL de água destilada, 5mL do reagente de Folin – Ciocalteu, 20mL de carbonato de sódio a 20% (m/v) e agitou-se. Deixou-se a mistura homogeneizada ao abrigo da luz em repouso por cerca de 30 minutos. Determinou-se a absorvância a 750nm com percurso óptico de 1 cm os testes foram realizados em duplicate.

A curva de calibração para a determinação do teor TCF foi construída usando o ácido tanico como padrão.

Preparação das soluções – padrão de ácido tânico

A partir da solução stock de 100 µg/mL de ácido tânico foram preparados os padrões como mostra de forma resumida a tabela 3.

Tabela 4. Resumo de preparação das soluções – padrão de ácido tanico

Solução	Concentração (µg/mL)	Volume tomado do stock (mL)	V(mL) CaCO₃	V (mL) de Folin–Ciocalteu	V. Final (mL)
Branco	0,0	0,0	20,0	5,0	100
Padrão 1	5,0	5,0	20,0	5,0	100
Padrão 2	10,0	10,0	20,0	5,0	100
Padrão 3	15,0	15,0	20,0	5,0	100
Padrão 4	20,0	20,0	20,0	5,0	100

6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Resultados qualitativos e discussão

Nas tabelas 5, 6 e 7 estão apresentados os resultados dos testes fitoquímicos para as amostras de chá.

Tabela 5. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos do chá *Socone* (chá de Gurùé)

Classe dos metabólitos	Testes fitoquímicos	Fracção			
		n – Hexano (Hex)	Diclorometano (DCM)	Acetato de etilo (Ac-Et)	Hidroalcoólico (HA)
Flavonóides	Shinoda	(-)	(-)	(+)	(+)
	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	Alcalino	(-)	(+)	(+)	(+)
	Ácido	(-)	(-)	(+)	(+)
Quinonas	NaOH	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(-)	(-)	(-)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(+)	(+)
Fenóis	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
Triterpenóides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)
Esteroides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(+)	(+)

Legenda: (+) – Teste Positivo (presença); (-) – Teste Negativo (ausência)

Tabela 6. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos do chá *Five Roses* (chá de RSA)

Classe dos metabólitos	Testes fitoquímicos	Fracção			
		n – Hexano (Hex)	Diclorometano (DCM)	Acetato de etilo (Ac-Et)	Hidroalcoólico (HA)
Flavonóides	Shinoda	(-)	(-)	(+)	(+)
	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	Alcalino	(-)	(+)	(+)	(+)
	Ácido	(-)	(-)	(+)	(+)
Quinonas	NaOH	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(-)	(-)	(-)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(+)	(+)
Fenóis	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
Triterpenóides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(+)	(+)
Esteroides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)

Legenda: (+) – Teste Positivo (presença); (-) – Teste Negativo (ausência)

Tabela 7. Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos do *Green tea* (chá da China)

Classe dos metabólitos	Testes fitoquímicos	Fracção			
		n – Hexano (Hex)	Diclorometano (DCM)	Acetato de etilo (Ac-Et)	Hidroalcoólico (HA)
Flavonóides	Shinoda	(-)	(-)	(+)	(+)
	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	Alcalino	(-)	(+)	(+)	(-)
	Ácido	(-)	(-)	(+)	(+)
Quinonas	NaOH	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(-)	(-)	(-)	(+)
Taninos	FeCl ₃	(+)	(+)	(+)	(+)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	(-)	(-)	(+)	(+)
Fenóis	FeCl ₃	(-)	(-)	(-)	(-)
Triterpenóides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(-)
Esteroides	H ₂ SO ₄	(-)	(-)	(-)	(+)

Legenda: (+) – Teste Positivo (presença); (-) – Teste Negativo (ausência)

➤ **Teste de presença de flavonoides**

- ✓ No teste de *Shinoda* – Em todas as amostras o resultado foi positivo para as fracções de Ac-Et e HA, com o desenvolvimento de uma coloração rósea.
- ✓ No teste de *cloreto de ferro (III)* – Todas as amostras tiveram resultado positivo (coloração que variou de verde e amarelo – acastanhado) em todas as fracções.
- ✓ Teste do *meio alcalino* – Todas as amostras tiveram resultado positivo, que se verificou com o desenvolvimento da coloração amarela nas fracções de DCM e Ac-Et e na fracção HA as amostras *Sc* e *5R* tiveram resultado positivo e a amostra *GT* teve resultado negativo, os testes foram realizados com a adição de NaOH nas fracções.

- ✓ Teste do *meio ácido* – Todas as amostras tiveram resultado positivo (desenvolvimento da coloração vermelha) nas fracções de Ac-Et e HA, os testes foram realizados com a adição de H₂SO₄

- **Teste de presença de quinonas**
 - ✓ No teste de presença de quinonas todas as amostras tiveram resultado negativo em todas as fracções.

- **Teste de presença de saponinas**
 - ✓ No teste de *espuma* todas as amostras tiveram resultado positivo na fracção HA.

- **Teste de presença de taninos**
 - ✓ Teste de *cloreto de ferro (III)* – Todas as amostras tiveram resultado positivo em todas as fracções, pelo desenvolvimento da coloração verde nas fracções de Hex e DCM, e precipitados pretos nas fracções de Ac-Et e HA.
 - ✓ Teste de *acetato de chumbo* – As amostras de *Green tea e Five Roses* tiveram resultado positivo pelo aparecimento de precipitados volumosos nas fracções de Ac-Et e HA.

- **Teste de presença de fenóis**
 - ✓ Teste de *cloreto de ferro (III)* – Todas as amostras tiveram resultados negativos em todas as fracções.

- **Testes de presença de terpenóides**
 - ✓ Teste de *anidrido acético & ácido sulfúrico* – As amostras de *GT e Sc* tiveram resultados negativos em todas as fracções e a amostra de *5R* teve resultado positivo (desenvolvimento da coloração marrom na parte inferior) nas fracções de Ac-Et e HA.

- **Testes de presença de esteróides**
 - ✓ Teste de *anidrido acético & ácido sulfúrico* – A amostra de *5R* teve resultado negativo em todas as fracções e a amostra de *Sc* teve resultado positivo (desenvolvimento da coloração vermelha) nas fracções de Ac-Et e HA e a amostra de *GT* teve resultado positivo na fracção HA.

6.2. Testes quantitativos e discussão

Na tabela 8 e na figura 17 está apresentado o teor total de compostos fenólicos em equivalentes de ácido tânico nas amostras de chá em estudo.

Tabela 8. Teor total de compostos fenólicos em mg de equivalentes do ácido tânico

Amostras	TCF _{eq AT} (mg/g amostra)
<i>Socone tea (Sc)</i>	74,14 ± 2,58
<i>Five Roses (5R)</i>	101,73 ± 5,44
<i>Green tea (GT)</i>	95,29 ± 1,22

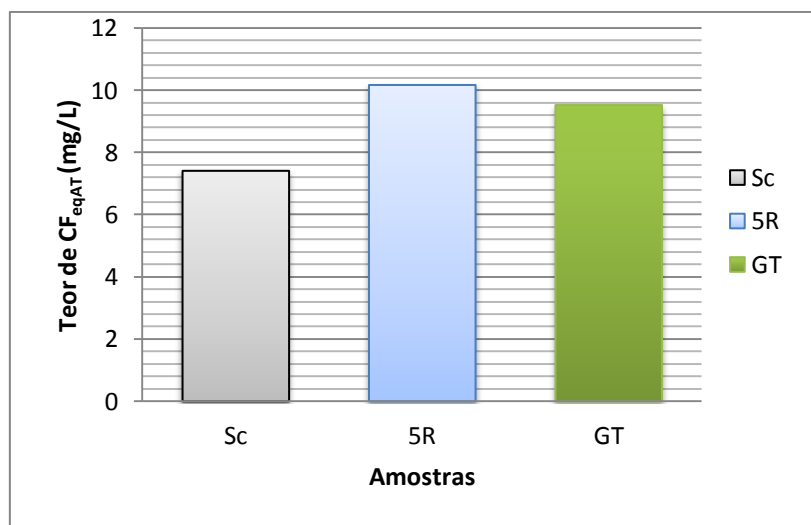


Figura 17. Gráfico do teor de CF nos chás: Sc, 5R e GT

A combinação do tempo (5 minutos) e a temperatura da água (100°C) utilizada para a preparação das infusões (chá) em estudo, tem sido descrito por muitos autores como uma combinação eficiente para a extracção de compostos fenólicos (Katalinic *et al*, 2006; Lima *et al*; 2004).

O chá 5R apresentou maior quantidade de $\text{TCF}_{\text{eq AT}}$ em mg/g amostra com $101,73 \pm 5,44$, seguido pelo chá GT com $95,29 \pm 1,22$ e o chá Sc que apresentou menor quantidade com $74,14 \pm 2,58$, conforme estão apresentados na tabela 8.

Conforme o esperado o teor de total de compostos fenólicos ($\text{TCF}_{\text{eq AT}}$) no chá verde **GT** e preto **5R** não apresenta grandes diferenças, contudo o chá preto **Sc** apresentou uma ligeira diferença, entretanto é necessário considerar que vários factores podem afectar o $\text{TCF}_{\text{eq AT}}$ encontrados nas infusões tais como: forma de preparo (tempo e temperatura das infusões), características do cultivo (solo, clima, uso de fertilizantes), processamento do chá (adição de conservantes, aromatizantes, corantes etc.) e forma de armazenamento (em pacotes ou saquetas) segundo pereira *et al*, (2009).

O teor total de compostos fenólicos encontrado nos chás GT e Sc é inferior àquele descrito na literatura, enquanto o do chá 5R é superior. Segundo Sakanaka *et al*, (1989) em 100mL de chá verde há cerca de 100 mg de compostos fenólicos, enquanto Riemersma *et al*, (2001) ressalta que em uma chávena normal de chá verde há aproximadamente 166 à 193 mg de compostos fenólicos. Segundo Lima *et al*, (2004) no chá preto o teor total de compostos fenólicos expresso em catequinas é de 99,77 mg/g de amostra.

7. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

7.1. Conclusões

Os ensaios fitoquímicos realizados com reagentes específicos para o reconhecimento das classes de compostos fenólicos nas amostras de chá preto nacional (*Socone tea*) e importado (*Five Roses*) e no chá verde (*Green tea*) no presente trabalho indicaram a presença de flavonóides, saponinas, taninos em todas as amostras, esteróides nos chás *Socone tea* e *Green tea* e triterpenóides no chá *Five Rose*. A presença destes metabólitos com propriedades farmacológicas cientificamente provados, confere aos chás um valor medicinal.

Os ensaios quantitativos realizados com um método específico para determinar o teor total de compostos fenólicos indicaram que o chá *Five Rose* tem $101,73 \pm 5,44$ mg de equivalentes do ácido tânico por grama da amostra, o chá *Green tea* tem $95,29 \pm 1,22$ mg de equivalentes do ácido tânico por grama da amostra e o chá *Socone tea* com $74,14 \pm 2,58$ mg de equivalentes do ácido tânico por grama da amostra.

A diferença dos resultados fitoquímicos e quantitativos podem ser explicados pelo simples facto de que a composição fitoquímica e quantitativa dos chás pode variar de acordo com a região onde se faz o cultivo, processamento dos chás, uso de aditivos, forma de conservação, dentre outras variáveis.

1.1. Recomendações

Recomenda-se que se façam ensaios *in vitro* das fracções obtidas e, em caso de apresentarem actividade biológica, se identifiquem os componentes das fracções que são responsáveis pela actividade biológica verificada.

Recomenda-se que se façam ensaios da capacidade antioxidante, poder redutor e a capacidade de quelar radicais livres das fracções obtidas e dos chás, e se identifiquem os componentes com maior actividade química verificada.

Recomenda-se que se façam estudos mais aprofundados dos outros tipos de chás produzidos por outras plantas, com outro tipo de processamento que são comercializados na cidade de Maputo ou em todo o país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angelo, P. M.; Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. **vol: 66, n. 1**. pp. 1-9.

Antolovich, M. Prenzler, P. Robards, K. Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Critical Review. Analyst*. **vol: 125**. pp. 989-1009.

Balasundram, N. Sundram, K. Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*. **vol. 99 n. 1**. pp. 191-203.

Balentine, D. A. Harbowy, M. E. & Graham, H. N. (1998). Tea: The Plant and its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage. *California: CRC Press LLC, Florida, U.S*. pp. 40 - 77.

Brito, H. O. Noronha, E. P. e França, L. M. (2008). Análise da Composição Fitoquímica do Extracto Etanólico das Folhas da *Annona squamos*. *Revista Brasileira de Farmácia*. **vol: 89 n. 3**. pp. 180-184.

Camargo, L. E. A; (2011); *Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da Camellia sinensis (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção*; [Dissertação de pós-graduação em Ciências Farmaceuticas; Universidade Federal do Centro-Oeste- Brasil].

Cavalcanti, A. S. S. Jaqueline A. B. R. Mariana S. C. S. L. & Ary G. S. (2010). Uso do chá verde, *Camellia sinensis* L. (Theaceae) em produtos tópicos. *Revista Natureza on line*. **vol. 5, n. 2**. pp. 76-84,

Chá do Gurù disponível em: <http://milhasnauticas.blogspot.com/2012/04/cha-do-gurue.html>; acessado no dia 21/04/2014

Comissão Europeia. (2010): II (Comunicações). *Jornal Oficial da União Europeia*. **vol. C, n 43**. pp. 1-60

Del Rio, D. Stewart, A. J. Mullen, W. Burns, J. Lean, M. E. J.; Brighenti, F. Crozier, A. (2004). HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **vol. 52**. pp. 2807-2815.

Di Stasi, L. C. (1995) *Plantas Medicinaias. Arte e ciência. Ed. Unesp*. São Paulo. pp 108-119.

El-Aa1, H.A. A. Halaweish, F.T. (2013). Food Preservative Activity of Phenolic Compounds in Orange Peel Extracts (*Citrus Sinensis* L.). *Lucrări Științifice*. **vol. 53**. pp. 233 – 240

Friedman, M. Soo-Yeun, K. Sin-Jung, L. Gyeong-Phil, H. Jae-Sook, H. Kap-Rang, L. Nobuyuke, K. (2005). Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the united states. *Journal of Food Science* **vol.70**. pp. 550 – 559

Garcia, J. N. (1961). *A Cultura de chá em Moçambique*; Relatório final do Curso de Engenheiro Agrônomo. Lisboa, UTL

Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. 3ª edição. Chapman and Hall. London. Great Britain. pp.1-7

Hashimoto, F. (1998). Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B,B'- linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolong theanin from oolong tea. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **vol. 2**. pp. 1676-1684.

Haslam, E. (2003). Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry*. **vol. 64**, pp. 61-73.

Heldt, H. (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. University Press. Oxford. pp297.

Hilal, Y. & Engelhardt, U. (2007). Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. pp. 414 – 421.

<http://br.geocities.com/plantastoxicas/alcaloides.html> acessado em 16/09/2014

<http://www.friedli.com/herbs/phytochem/alkaloids/alkaloid1.html> acessado em 16/09/2014

Katalinic, V. Milos, M.; Kulisic, T. Jukic, M. (2006). Screening 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*. **vol. 94**. pp. 550 – 557.

Khokhar, S. & Magnusdottir S. (2002). Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **vol. 50**. pp. 565-570.

Lee, S. J. Umamo K, Shibamoto T, Lee K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*) and thyme leaves (*Thymes vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. **vol. 91, n. 1**. pp. 131-137

Leung, L. K. Su, Y. Chen, R. Zhang, Z. Huang, Y. Chen, Z. Y. (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*. **vol. 131**. pp. 2248 – 2251.

Lima, V. L. A. G. Melo, E.A. Lima, D. E. S. (2004). Teor de compostos fenolicos totais em chás brasileiros; *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas; **vol. 7, n 2**. pp. 187 – 190.

Lin, J. K. Lin C. L. Liang Y.C. Lin – Shiau, S.Y. Juan I.M. (1998). Survey of Catechins, Gallic acid, and Methylxanthines in Green, Oolong, pu-erh, and Black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **vol. 46**. pp. 3635 – 3642.

Lobo, A. M., (1976). *Biossíntese de produtos naturais, metabolismo secundário*, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

Luque – García, J. L. Castro, M. D. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*. **vol. 22, n 1**. pp. 41-7.

Manach, C. Scalbert, A. Morand, C. Révész, C. Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **vol. 79, n-5**. pp 727 – 747.

Mann, J. Davdson, R. S. (1993). *Natural Products, their Chemistry and biological significane*, Longman Group UK

Martínez –Valverde, I. Periago, M. J. Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **vol. 50, n 1**. pp. 5-18.

Mahave, M. J. J. (2008). *Características físico – químicas do Cha preto (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze) Nacional*. [Monografia apresentada à Universidade Eduardo Mondlane para a obtenção do grau de Licenciado em Química].

Matos, F. J. A. (1997). *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ª edção. Fortaleza edições UFC. pp. 141.

Matsuy, Y. Kobayashi, K. Masuda, H. Kigoshi, H. Akao, M. Sakurai, H. Kumagai, H. (2009). Quantitative Analysis of Saponis in a Tea-Leaf extract and Their Antihyperchlolesterolemic Activity. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*. **vol. 73**. p. 1513-1519.

Melecchi, M. I. S. (2005). *Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus L: Estudo comparativo de métodos de extração*. Porto Alegre: UFRGS, [Monografia apresentada à Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul pra a obtenção do grau Doutor em Química].

Miguel, A.; Andrade, J. B. (1989); Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **vol. 35**. pp. 35-41.

Milcent, R. (2003). *Chimie Organique Hétérocyclique, Structures fondamentales, Chimie et Biochimie des Principaux Composés Naturels*, Editora EDP Sciences, França.

Morrison, R. T. & Boyd, R. N. (2005); *Química Orgânica*; 14ª edição; Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 1510

Naczka, M. Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. **vol. 1054, n. 1/2**. pp. 95-111.

Naczka, M. Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **vol. 41**. pp. 1523-1542.

Pereira, A. V. Almeida, T. C. Beltrame, F. L. Costa, M. E. & Garrido, L. H. (2009). Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Scientiarum Health Sciences*. **vol. 31, n 2**. pp. 119-124.

Peres, L. E. P. (2008). *Metabolismo Secundário*; Disponível em: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>. Acesso em: 17/09/2014

Peterson, J. Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, **vol. 18, n, 12**. pp. 1995-2018,

Planta do chá (*Camellia sinensis*) disponível em: <http://www.msstate.edu/org/arboretum/camsin.htm> : acessado em 21/04/2014

Rice – Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism and bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*. **vol. 36, n-7**. pp. 827 – 828.

Riemersma, R. A.; Rice-Evans, C. A.; Tyrrell, R. M.; Clifford, M. N.; Lean, M. E. J. (2001). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Q J Medicals*. **vol. 94, n, 5**. pp. 277-282.

Robards, K. (2003). Strategies for the Determination of Bioactive Phenols in Plants, Fruit and Vegetables. *Journal Of Chromatography* **vol. 1000**, pp. 657-691.

Sakanaka, S. Kim, M. Taniguchi, M. Yamamoto, T. (1989). Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*. **vol. 53, n, 2**. pp. 2307-2311,

Schmitz, W. Saito, A. Y. Estevão, D. Saridaki, H. O. (2005). O Chá Verde e Suas Ações como Químico – protetor. *Ciências Biológicas e da Saúde*. **vol. 26, n. 2**. pp 119-130.

Schuh, C. Schieberle, P. (2006). Characterization of the Key Aroma Compounds in the Beverage Prepared from Darjeeling Black Tea: Quantitative Differences between Tea Leaves and Infusion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **vol. 54**, pp. 916 – 924.

Schulz, V. Hansel R. & Tyler, V. E. (2002). *Fitoterapia racional*; Guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 4 ed. São Paulo. Manole.

Scoparo, C. T. (2011). *Análise dos Polissacarídeos Presentes em Camellia sinensis e Desenvolvimento de Cromatografia Líquida Bidimensional Abrangente Para Compostos de*

Baixa Massa Molecular. [Monografia apresentada à Universidade Federal do Paraná para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica]

Senger, A. E. V. Schwanke C. H. A. Gottlieb. M. G. V. (2010). Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Artigo de Revisao Scientia Medica*. vol. 20, n 4. pp. 292-300

Shahidi, F. Naczk, M. (1995). Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. *Lancaster Technomic*.

Simões, C. M. O. Schenkel, E. P. Gosmann, G. Mello, J. C. P. Mentz, L. A. Petrovick, P. R. (2004). *Farmacognosia – Da Planta ao Medicamento*; 5 ed. Editora UFS; Porto Alegre,

Taiz, L. Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*; 3 edição; Artimed; Porto Alegre

Tanaka, T. (2003). Production of theasinensins A and D, epigallocatechingallate dimers of black tea, by oxidation–reduction dismutation of dehydrotheasinensin. *Tetrahedron*. vol. 59. pp.7939 - 7947.

Thangapazham, R. L. A. K. Singh, A. Sharma, J. Warren, J. P. Gaddipati & Maheshwari, R. K. (2007). Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechingallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*. vol. 245. pp. 232–241.

Wang, Y. F. Wei, X. L. Jin, Z. Y. (2009). Structure analysis of a neutral polysaccharide isolated from green tea. *Food Research International*. vol. 42. pp. 739-745.

WHO –World Health Organization (1988). *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneva.

ANEXOS

ANEXO A: Formulas usadas para cálculos

1. Determinação do teor total de compostos fenólicos

$$\frac{TCF_{eqTA}(\mu g * mL^{-1}) * F dil * Va(mL)}{Xa} = TCF_{eqTA} \text{ em } 1g \text{ de chá}$$

onde:

TCF_{eqTA} = Teor total de compostos fenólicos em equivalentes de ácido tânico

F dil = factor de diluição

Va = volume da solução preparada

Xa = massa (g) da amostra de chá.

2. Determinação da média amostral

$$\bar{x} = \frac{\sum Xi}{n}$$

onde:

\bar{x} = médiaEscreva uma equação aqui.

n = número de determinações

Xi = resultado individual da análise

3. Determinação do desvio padrão

$$s = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Onde:

s = desvio padrão

4. Determinação de desvio padrão relativo

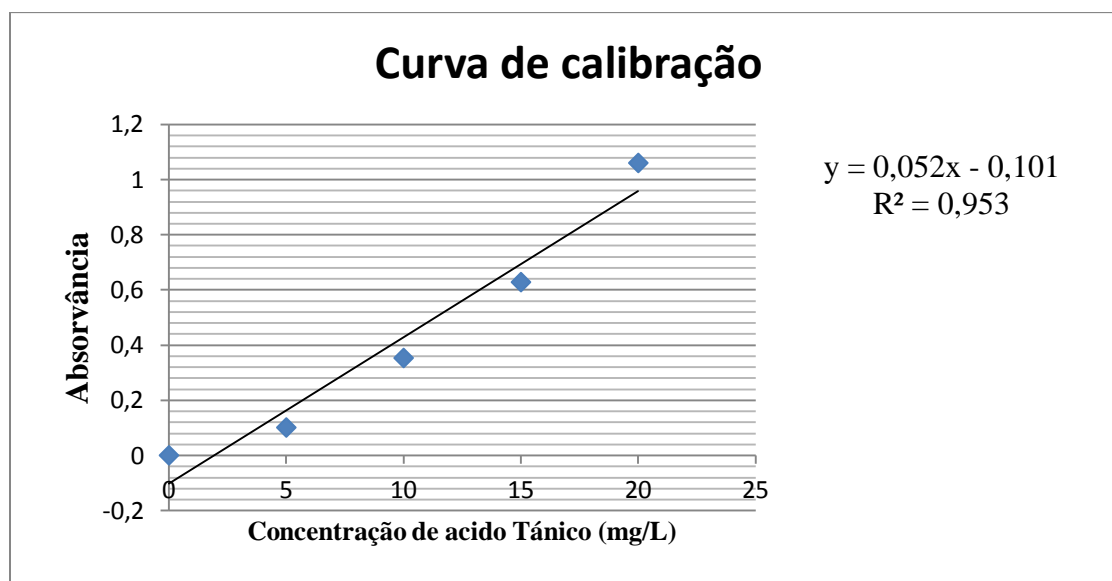
$$\%RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

onde:

% RSD = percentagem desvio padrão relativo.

ANEXO B: Tabela e gráfico de absorvância do padrão (ácido tânico)

Padrão	Concentração (mg/L)	Abs
P – 1	5	0.101
P – 2	10	0.353
P – 3	15	0.628
P – 4	20	1.060



ANEXO C: Tabela de absorvância das amostras e seus teores totais de compostos fenólicos

Amostra	Abs1	Abs2	TCF(mg/L)	TCF(μ g/mL)	TCF(μ g/mg)	TCF(mg/g)	M _{TCF} (mg/g)	s	%RSD
Sc	0,294	0,275	7,596	7,231	75,96	72,31	74,14	2,58	3,48
5R	0,408	0,448	9,788	10,558	97,88	105,58	101,73	5,44	5,35
GT	0,390	0,399	9,442	9,615	94,42	96,15	95,29	1,22	1,28

ANEXO D: Preparação das soluções

Solução stock de ácido tânico a 100µg/mL

Pesou-se 1g de ácido tânico e dissolveu-se num copo de precipitação. Transferiu-se a solução para um balão de 100mL e perpez-se o volume.

Da solução acima preparada transferiu-se 1 mL para um balão de 100 mL e perpez-se o volume.

Solução de cloreto férrico a 1%

Pesou-se 1g de cloreto férrico e dissolveu-se num copo de precipitação. Transferiu-se a solução para um balão de 100mL e perpez-se o volume.

Solução de cloreto férrico a 5%

Pesou-se 5g de cloreto férrico e dissolveu-se num copo de precipitação. Transferiu-se a solução para um balão de 100mL e perpez-se o volume.

Solução aquosa de NaCl a 10%

Pesou-se 5g de NaCl e introduziu-se num copo de Becker para a dissolução. Transferiu-se para um balão de 50 mL e perpez-se o volume com água destilada.

Solução aquosa de NaOH a 10%

Pesou-se 10g de NaOH e introduziu-se num copo de Becker e dissolveu-se. Transferiu-se para um balão de 100 mL e perpez-se o volume com água destilada.

Solução aquosa de Acetato de Chumbo [Pb(CH₃COO)₂] a 10%

Pesou-se 10g de acetato de chumbo e introduziu-se num copo de Becker para a dissolução. Transferiu-se para um balão de 100 mL e perpez-se o volume com água destilada.

Solução de NH₄OH a 10 %

Numa proveta de 100 mL mediu-se 10g da solução de amónia e introduziu-se num balão volumétrico de 100mL e perpez-se o volume com água destilada.

ANEXO E: Material usado



Figura 1. Rotavapor



Figura 2. Extractor Soxhlet