

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA TOLEDO SCOPARO

**ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES EM *Camellia sinensis* E
DESENVOLVIMENTO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL
ABRANGENTE PARA COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**

**CURITIBA
2011**

CAMILA TOLEDO SCOPARO

**ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES EM *Camellia sinensis* E
DESENVOLVIMENTO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL
ABRANGENTE PARA COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Dr. Lauro Mera de Souza

CURITIBA
2011

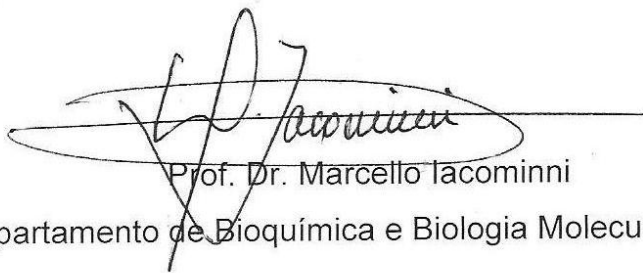
Orientador: Prof. Dr.Marcello Iacomini
Co-orientador: Dr. Lauro Mera de Souza

TERMO DE APROVAÇÃO

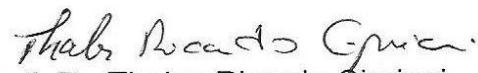
CAMILA TOLEDO SCOPARO

**ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES EM *Camellia sinensis* E
DESENVOLVIMENTO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL
ABRANGENTE PARA COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**

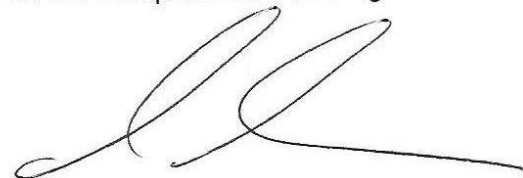
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Marcello Iacomini
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dr. Anderson Barison
Departamento de Química, UFPR

Curitiba, 16 de dezembro de 2011

Dedico esse trabalho de mestrado a meus amados pais, José Roberto Scoparo e Tânia Scoparo e a minha amada irmã gêmea, Carina Toledo Scoparo. Vocês tornaram possível a realização de um sonho, e de forma ativa participaram da concretização desta conquista, a vocês eu dedico o meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que estiveram ao meu lado e me ajudaram de alguma forma em todas as etapas do meu mestrado.

Desta forma, em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por estar sempre comigo, nos momentos bons e ruins, me amparando quando preciso.

Ao Prof. Marcello Iacomini, pela orientação, confiança e liberdade que me foi concedida nesses dois anos.

Ao Lauro Mera de Souza pelos ensinamentos, pela orientação, pela paciência, pela ajuda, amizade, enfim, por tudo que fez para e por mim.

Aos meus pais que estiveram ao meu lado, me apoiando, mesmo à distância, em todos os momentos de minha vida, que compartilharam comigo minhas vitórias e me deram força nos momentos em que mais precisei. Os amo infinitamente.

À minha irmã amada, Carina, por ser metade de mim, metade de meu coração, metade de minha vida, obrigada por todas as conversas, conselhos, risadas, companheirismo, enfim obrigada por tudo que você representa em minha vida.

A toda minha família por todo amor e apoio.

À Normanda (neném) com quem tive o imenso prazer de morar estes dois anos, que é na verdade minha outra irmã, que sempre esteve ao meu lado, me ajudou e me apoiou muito em todos os momentos que estivemos juntas.

À Nessa (txuca) por toda amizade, apoio, ajuda com meus experimentos, conselhos, amparo, e é claro todo companheirismo. Te adoro muito. Pode contar sempre comigo!!!

À Yanna Dantas (xuxu) com quem tive o prazer de realizar alguns experimentos, mas que acima de tudo é uma pessoa maravilhosa. Obrigada por toda ajuda e todas as conversas!!

À Cris Baggio da Farmacologia, pelos experimentos realizados.

Ao Prof. Thales Cipriani pelos conselhos e sugestões.

Ao Prof. Gorin pelas correções, principalmente em meu artigo.

Ao Arqui pelas análises e todo auxílio, sempre disposto a me ajudar.

Ao Daniel, por todas as risadas, toda ajuda, todos os conselhos e conversas.

À Simone, pessoa encantadora que tive o prazer de conhecer no início de meu mestrado (lembra-se como nos conhecemos Sí? segredo nosso!!). Te considero uma grande amiga minha.

À Fer Simas, pelo auxílio e ajuda com meus experimentos.

Ao Luciano (xuxu), pelo apoio, amizade e empréstimos.

Ao Danilo por toda amizade, conversas e conselhos.

Aos meus amigos da Bioquímica no geral, que de alguma forma fizeram parte de alguns momentos ou que me ajudaram de alguma forma neste período.

Aos colegas dos laboratórios pelos momentos passados juntos e ajuda nos experimentos: Ana Helena, Andrea, Rosane, Eliz, Flávio, Cíntia, Nadi, Stephanie, Vanessa, Thaís, Georgia, Elaine, Tati, Lou, Luciana e Pauline.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof^a Dr^a Sílvia M. Cadena por toda dedicação prestada a nós.

. A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A *Camellia sinensis* é uma espécie de planta cujas folhas são utilizadas amplamente na obtenção de infusões popularmente conhecidas como “chá”, sendo o mais conhecido o “chá verde”. Existem vários tipos de chás obtidos de *C. sinensis*, a principal diferença entre eles está baseada no processo de auto-oxidação catalisado pelas enzimas polifenol-oxidase e peroxidase. Assim, os chás são classificados em não oxidados (chá verde e branco), semi-oxidado (chá oolong), oxidado (chá preto) e pós-fermentado (chá pu-erh). No presente trabalho foram avaliados os polissacarídeos presentes no extrato aquoso dos chás verde e preto, assim como os compostos de baixa massa molecular presentes no extrato hidroalcoólico dos mesmos. Para o chá verde, após processo de fracionamento por congelamento e degelo, as análises de composição monossacarídica, HPSEC-MALLS e espectroscopia de RMN, indicaram a presença de ácido poligalacturônico com ligações 1→4, além da presença de uma arabinogalactana. O polissacarídeo extraído do chá preto apresentou também arabinose, galactose e ácido galacturônico como componentes majoritários, sugerindo a presença de uma estrutura péctica e de uma arabinogalactana do tipo II. Os polissacarídeos foram testados quanto às suas atividades antissepse, onde apresentaram discreta redução da letalidade de camundongos, e uma diminuição da atividade das enzimas mieloperoxidases, confirmando um efeito positivo desses polissacarídeos na sepsis. Também são apresentadas neste trabalho duas metodologias desenvolvidas para alcançar uma análise detalhada dos extratos hidroalcoólicos do chá verde e preto. Na primeira etapa, os extratos foram fracionados em água, *n*-butanol, acetato de etila e clorofórmio para separar os compostos de acordo com sua polaridade, rendendo amostras menos complexas para serem analisadas na cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada ao espectrômetro de massas (UHPLC-MS). Adicionalmente, uma técnica bidimensional abrangente da cromatografia líquida (2D-LC) que emprega a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) x fase reversa (C18) foi desenvolvida. Os seguintes compostos foram identificados (com base no tempo de retenção, espectros de UV, fragmentação por MS e comparação com padrões e literatura): catequinas; teaflavinas e seus derivados galatos; caempferol, quercetina e miricetina mono, di-, tri e tetraglicosídeos; ésteres do ácido quínico, ácido gálico e ácidos hidroxicinâmicos; alcalóides de purina, tais como a cafeína e a teobromina, além de lipídeos. Adicionalmente, foram encontrados compostos pela primeira vez relatados em *C. sinensis*, como isômeros de diversas saponinas já conhecidas e quatro glicosídeos de miricetina, quercetina e caempferol, contendo ésteres de ácido gálico. Os extratos hidroalcoólicos também foram submetidos à avaliação de sua atividade gastroprotetora, sendo que estes reduziram significativamente a ocorrência de lesão gástrica induzida por etanol.

Palavras-chaves: *Camellia sinensis*, chá verde, chá preto, polissacarídeos, 2D-LC, UHPLC, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The *Camellia sinensis* is a species of plant whose leaves are widely used in infusions popularly known as "tea", such as "green tea". There are many types of tea from *C. sinensis*, their difference is based on the process of auto-oxidation catalyzed by the enzymes polyphenoloxidase and peroxidase, so they are classified in non-oxidized (green and white tea), semi-oxidized (oolong tea), oxidized (black tea) and post-fermented (pu-erh tea). In the present study we evaluated the polysaccharides present in the aqueous extract of green and black teas, as well as low molecular weight compounds present in hydro-alcoholic extract of same. In green tea, after fractionation process by freezing-thawing, monosaccharide composition, HPSEC-MALLS and NMR analyses, the presence of a galacturonic acid 1→4 linked, as well as an arabinogalactan were confirmed. Similarly, the polysaccharides from black tea also contained arabinose, galactose and galacturonic acid as the main components, suggesting a pectic structure and arabinogalactan. The polysaccharides were tested for their anti sepsis activity, which showed a discreet reduction of the mortality of mice, and a decrease in activity of the enzymes mieloperoxidases, that confirms the positive effect of the polysaccharides in the sepsis process. Also, it were described two methodologies aiming to achieve a comprehensive analysis of hydro-alcoholic extracts of *C. sinensis*. In the first one, the extracts were partitioned in water, *n*-buthanol, ethyl acetate and chloroform for fractionating compounds according to their polarity, yielding less complex samples to be analyzed by ultra high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS). Additionally, a comprehensive bidimensional liquid chromatography (2D-LC) employing size exclusion chromatography (SEC) x reversed phase (C18) was developed. Based on their retention time, UV-spectra, MS-fragmentation profile and by comparison with literature, the following compounds were identified: catechins; theaflavins and their gallate derivatives; mono-, di-, tri- and tetraglycosides of kaempferol, quercetin and myricetin; esters from quinic, gallic and hydroxycinnamic acids; purine alkaloids, such as caffeine and theobromine, and so lipids. Additionally, unreported compounds in *C. sinensis* were now found, such as isomers of many known saponins and esters of gallic acid of four glycosides of myricetin, quercetin and kaempferol. The hydro-alcoholic extracts were also subjected to evaluation of their gastroprotective activity, and these have significantly reduced the occurrence of gastric lesions induced by ethanol treatment.

Keywords: *Camellia sinensis*, green tea, black tea, polysaccharides, 2D-LC, UHPLC, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ILUSTRAÇÃO DE UM RAMO DE <i>Camellia sinensis</i>	25
FIGURA 2 –	PROCESSAMENTO DOS TIPOS DE CHÁS DE <i>Camellia sinensis</i>	29
FIGURA 3 –	PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO E SUAS INTERLIGAÇÕES.....	31
FIGURA 4 –	ESTRUTURAS DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE <i>C. sinensis</i>	34
FIGURA 5 –	PRINCIPAIS LIPÍDEOS ENCONTRADOS EM <i>C. sinensis</i>	36
FIGURA 6 –	ESTRUTURA BÁSICA DE FLAVONÓIDES.....	37
FIGURA 7 –	SUBCLASSES DOS FLAVONÓIDES.....	38
FIGURA 8 –	PRINCIPAIS FLAVONÓIS/CATEQUINAS PRESENTES NOS CHÁS	39
FIGURA 9 –	PRINCIPAIS TEAFLAVINAS PRESENTES NO CHÁ PRETO... ..	40
FIGURA 10 –	REPRESENTAÇÃO DE A) FLAVONOL GLICOSÍDEO E B) FLAVONA GLICOSÍDEO.....	41
FIGURA 11 –	EXEMPLOS DE TANINOS HIDROSILÁVEIS E CONDENSADOS.....	41
FIGURA 12	EXEMPLOS DE ALCALÓIDES DO CHÁ VERDE E PRETO.....	42
FIGURA 13 –	EXEMPLOS DE CADA CLASSE DE TERPENOS.....	43
FIGURA 14 –	ESTRUTURAS CONHECIDAS DE SAPONINAS DE FOLHAS DE <i>C. sinensis</i>	44
FIGURA 15 –	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS PELA EXTRAÇÃO AQUOSA DO CHÁ VERDE E PRETO.....	60
FIGURA 16 –	TLC DAS FRAÇÕES V-SOL-GD e P-SOL-GD	62
FIGURA 17 –	ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE POR HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES V-SOL-GD E P-SOL-GD	63
FIGURA 18 –	ESPECTRO UNIDIMENSIONAL DE ¹³ C NMR DAS FRAÇÕES V-SOL-GD E P-SOL-GD EM D ₂ O A 70 °	65
FIGURA 19 –	CURVA DE LETALIDADE NA SEPSE EM ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM OS POLISSACARÍDEOS DOS CHÁS VERDE E PRETO.....	68
FIGURA 20 –	ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MODIFICAÇÕES NA DENSIDADE ÓPTICA POR MILIGRAMA DE PROTEÍNA.....	69
FIGURA 21 –	CROMATOGRAMA UHPLC-PDA DOS EXTRATOS	71

	HIDROALCOÓLICOS V-ET70 E P-ET70	
FIGURA 22 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO AQUOSA DO CHÁ VERDE (V-Aq)	72
FIGURA 23 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DO CHÁ VERDE (V-BuOH).....	74
FIGURA 24 –	CROMATOGRAMA DOS NOVOS FLAVONÓIS GLICOSILADOS ENCONTRADOS EM <i>C. sinensis</i> E ESPECTROS DE MASSAS DESTES COMPOSTOS, COM SUAS DEVIDAS ESTRUTURAS PROPOSTAS.....	75
FIGURA 25 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CHÁ VERDE (V-AcEt).....	76
FIGURA 26 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DO CHÁ VERDE (V-CHCl₃).....	77
FIGURA 27 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO AQUOSA DO CHÁ PRETO (P-Aq).....	78
FIGURA 28 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DO CHÁ PRETO (P-BuOH).....	79
FIGURA 29 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CHÁ PRETO (P-AcEt).....	80
FIGURA 30 –	CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DO CHÁ PRETO (P-CHCl₃) COM INSERTO DA REGIÃO DETECTADA POR ELSD.....	80
FIGURA 31 –	GRÁFICOS PLOTADOS 2D SEC X UHPLC DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DO CHÁ VERDE OBTIDO EM 325 nm.....	86
FIGURA 32 –	CROMATOGRAMA 2D COM DETECÇÃO EM 275 nm, MOSTRANDO OS FLAVAN-3-OLS E AS XANTINAS E CROMATOGRAMAS 2D OBTIDOS COM ELSD.....	87
FIGURA 33 –	GRÁFICO 2D SEC x RP-UHPLC DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO CHÁ PRETO OBTIDO EM 325 nm.....	88
FIGURA 34 –	EFEITO PROTETOR DE V-ET70 (10, 30 E 100 mg/kg, <i>P.O.</i>), E P-ET70 (1, 3, 10 E 30 mg/kg, <i>P.O.</i>) CONTRA LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL.....	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA PARA O CHÁ VERDE E O CHÁ PRETO A PARTIR DE 100 g DE MATERIAL.....	61
TABELA 2 –	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO FRACIONAMENTO POR CONGELAMENTO E DEGELO.....	62
TABELA 3 –	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS E DAS FRAÇÕES RESULTANTES DO PARTICIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO OBTIDOS NO CHÁ VERDE E PRETO.....	70
TABELA 4 –	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DO CHÁ VERDE E PRETO NA ANÁLISE UNIDIMENSIONAL POR UHPLC-MS.....	81
TABELA 5 –	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PELA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL (2D-LC).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS*

Compostos químicos

AcOH	- Ácido acético
Ara	- Arabinose
CHCl ₃	- Clorofórmio
CLP	- Ligadura e perfuração do ceco
D ₂ O	- Óxido de deutério (água deuterada)
DGDG	- Digalactosildiacilglicerol
EtOAc	- Acetato de etila
EtOH	- Etanol
Gal	- Galactose
GalpA	- Ácido galacturônico
Glc	- Glucose
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
LiCl	- Cloreto de lítio
Man	- Manose
MeOH	- Metanol
MGDG	- Monogalactosildiacilglicerol
MPO	- Mieloperoxidase
Na ₂ SO ₄	- Sulfato de sódio anidro
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaN ₃	- Azida de sódio
NaNO ₂	- Nitrito de sódio

<i>n</i> -PrOH	- Propanol
PC	-Fosfatidilcolina
PE	- Fosfatidiletanolamina
PFO	-Polifenoloxidase
PG	- Fosfatidilglicerol
PGA	- Ácidos poligalacturônicos
PI	-Fosfatidilinositol
RGI	- Ramnogalacturonana tipo I
Rha	- Ramnose
Rib	- Ribose
Sac	- Sacarose
SQDG	- Sulfoquinovosildiacilglicerol
TFA	- Ácido trifluoracético

Extratos e Frações (sempre precedidos de V para chá verde e P para chá preto)

P-AcEt	- Fração acetato de etila do chá preto obtida do particionamento líquido-líquido
P-Aq	- Fração aquosa do chá preto obtida do particionamento líquido-líquido
P-Brt	- Fração do chá preto solúvel na extração aquosa
P-BuOH	-Fracção butanólica do chá preto obtida do particionamento líquido-líquido
P-CHCL ₃	- Fração clorofórmica do chá preto obtida do particionamento líquido-líquido
P-Et70	- Fração do chá preto obtida da extração hidroalcoólica (70% EtOH)
P-Ins-GD	- Fração do chá preto insolúvel no congelamento e degelo
P-Ppt-et	- Fração do chá preto precipitada obtida na precipitação etanólica
P-Res	- Fração do chá preto insolúvel na extração aquosa
P-Sob-et	- Fração do chá verde solúvel na precipitação etanólica

P-Sol-GD	- Fração do chá preto solúvel no congelamento e degelo
V-AcEt	- Fração acetato de etila do chá verde obtida do particionamento líquido-líquido
V-Aq	- Fração aquosa do chá verde obtida do particionamento líquido-líquido
V-Brt	- Fração do chá verde solúvel na extração aquosa
V-BuOH	- Fração butanólica do chá verde obtida do particionamento líquido-líquido
V-CHCl ₃	- Fração clorofórmica do chá verde obtida do particionamento líquido-líquido
V-Et70	- Fração do chá verde obtida da extração hidroalcoólica (70% EtOH)
V-Ins-GD	- Fração do chá verde insolúvel no congelamento e degelo
V-Ppt-et	- Fração do chá verde precipitada obtida na precipitação etanólica
V-Res	- Fração do chá verde insolúvel na extração aquosa
V-Sob-et	- Fração do chá verde solúvel na precipitação etanólica
V-Sol-GD	- Fração do chá verde solúvel no congelamento e degelo

Espectrometria de Massas, Cromatografia e Ressonância Magnética Nuclear

CID	- <i>Collision Induced Dissociation</i> (dissociação induzida por colisão)
ELSD	- <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> (detector evaporativo de espalhamento de luz)
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i> (ionização por spray de elétrons)
GC-MS	- <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
MS	- <i>Mass Spectrometry</i> (espectrometria de massas)

GPC	- <i>Gel Permeation Chromatography</i> (cromatografia por permeação em gel)
HPSEC	- <i>High pressure size exclusion chromatography</i> - (cromatografia de exclusão estérica)
m.u.	- <i>Mass units</i> (unidades de massa)
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
MALLS	- <i>Multiaangle laser-light scattering</i> (espalhamento de luz em multiângulos)
MS ²	- Espectro de fragmentação de massas (<i>tandem-MS</i>)
NMR	- <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (ressonância magnética nuclear)
NP	- <i>Normal Phase</i> (fase normal)
PDA	- <i>Photodiode Array</i> (arranjo de fotodiodos)
RID	- <i>Refractive Index Detector</i> (detector índice de refração)
RP	- <i>Reversed Phase</i> (fase reversa)
Rt	- Tempo de retenção relativo
SEC	- <i>Size Exclusion Chromatography</i> (cromatografia de exclusão estérica)
TIC	- <i>Total Ion Current</i> (análise de íons totais)
TLC	- <i>Thin Layer Chromatography</i> (cromatografia em camada delgada)
UHPLC	- <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra alta eficiência)

Termos associados às técnicas cromatográficas bidimensionais

<i>Offline</i>	- Quando as frações da primeira dimensão cromatográfica são transferidas à segunda dimensão indiretamente.
<i>Online</i>	- Quando as frações da primeira dimensão cromatográfica são transferidas diretamente com auxílio de uma válvula, à segunda dimensão.
<i>Abrangente (comprehensive)</i>	-Quando todas as frações da primeira dimensão são passadas para segunda dimensão, não apenas uma parte selecionada
<i>Heart-cutting</i>	-Quando apenas uma parte selecionada das frações passam da primeira para a segunda dimensão cromatográfica.
LC	- Cromatografia Líquida
1D-LC	- Cromatografia Líquida Unidimensional
2D-LC	- Cromatografia Líquida Bidimensional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICAS	23
2.2 <i>CAMELLIA SINENSIS</i>	24
2.2.1 Características botânicas da planta	24
2.2.2 Principais formas de utilização da planta	26
2.3 PROCESSAMENTO DOS CHÁS DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i>	26
2.3.1 Processo ortodoxo ou tradicional	27
2.3.2 CTC (<i>Crush, Tear e Curl</i> - esmagar, rasgar e enrolar)	28
2.3.3 Chá branco	29
2.3.4 Chá verde	29
2.3.5 Chá oolong	30
2.3.6 Chá preto	30
2.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA	30
2.4.1 Carboidratos	32
2.4.2 Lipídeos	35
2.4.3 Compostos fenólicos	36
2.4.4 Alcalóides	42
2.4.5 Terpenos	42
2.5 ANÁLISE DE COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR: TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	45
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELATADAS EM <i>C. SINENSIS</i>	47
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 OBJETIVO GERAL	49
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5 METODOLOGIA	50
5.1 OBTENÇÃO DOS CHÁS VERDE E PRETO	50
5.2 EXTRAÇÕES	50
5.2.1 Extração Aquosa	50
5.2.2 Extração Hidroalcoólica	51
5.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	51

5.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo	51
5.3.2 Fracionamento dos extratos hidroalcoólicos por partição líquido-líquido	51
5.4 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS	52
5.4.1 Hidrólise ácida total	52
5.4.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise	52
5.4.3 Dosagem de ácidos urônicos	52
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	53
5.5.1 Cromatografia em camada delgada (TLC - <i>Thin Layer Chromatography</i>)	53
5.5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS - <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>).....	53
5.5.3 Cromatografia de gel permeação (GPC - <i>Gel Permeation Chromatography</i>)	54
5.5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR – <i>Nuclear magnetic resonance</i>)	54
5.5.5 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC)	55
5.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	56
5.6.1 Avaliação da atividade dos polissacarídeos de <i>Camellia sinensis</i> em modelo de Sepse murina	56
5.6.1.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). .	58
5.6.1.2 Análise estatística	58
5.6.2 Avaliação da atividade gastroprotetora	58
5.6.2.1 Animais	58
5.6.2.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos	59
5.6.2.3 Análise Estatística	59
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
6.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. SINENSIS</i>	60
6.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE <i>C. SINENSIS</i>	61
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DO CHÁ VERDE E PRETO NA SEPSE	67

6.3.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos pulmões dos animais tratados ou não com os polissacarídeos do chá verde e preto	68
6.4 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR.....	70
6.4.1 Identificação de compostos por UHPLC-PDA-ESI-MS.....	70
6.4.2 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico do chá verde.....	71
6.4.2.2 Fração butanólica (V-BuOH).....	72
6.4.2.3 Fração acetato de etila (V-AcEt).....	76
6.4.2.4 Fração Clorofórmica (V-CHCl₃).....	76
6.4.3 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico do chá preto.....	78
6.4.3.1 Fração Aquosa (P-Aq)	78
6.4.3.2 Fração butanólica (P-BuOH).....	78
6.4.3.3 Fração acetato de etila (P-AcEt).....	79
6.4.3.4 Fração clorofórmica (P-CHCl₃).....	80
6.4.4 Metodologia de cromatografia líquida bidimensional abrangente.....	84
6.4.5 Análise dos compostos de baixa massa molecular por cromatografia bidimensional abrangente	85
6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA	93
7 CONCLUSÕES	95
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXO I.....	107

1 INTRODUÇÃO

Camellia sinensis é uma espécie de planta pertencente à família Theaceae (WICKREMASINGHE, 1978; HAROLD, 1992; SCHMITZ *et al.*, 2005), cujas folhas são utilizadas amplamente na obtenção infusões, conhecidas originalmente como “chá”. De acordo com o tipo de preparo prévio que as folhas são submetidas após colheita, o chá recebe ainda outra denominação popular, “chá verde” e “chá preto”, entre outros. Estima-se que o chá é consumido há mais de cinquenta séculos e, depois da água, é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo (CHANTRE; LAIRON, 2002).

A planta, original do Sudeste da China, foi gradualmente introduzida na Índia, Sri Lanka e, então, em muitos países tropicais e subtropicais. Os principais países produtores são China, Índia, Sri-Lanka, Quênia, Vietnã, Turquia, Indonésia e Japão. A Índia e a China têm alto consumo interno e sua exportação é apenas cerca de 20% da produção total, enquanto o Sri-Lanka e o Quênia têm uma exportação de mais de 90% da produção total (SIMÕES, 2004).

A principal diferença entre os tipos de chás está baseada no processo de auto-oxidação catalisado pelas enzimas polifenol-oxidase (PFO) e peroxidase. Basicamente a oxidação é o processo em que as folhas de *C. sinensis*, após sofrerem algum processamento (serem picadas, esmagadas ou secas, por exemplo), interagem com o oxigênio, escurecendo. Assim, os chás são classificados em não oxidados (chá verde e branco), semi-oxidado (chá oolong), oxidado (chá preto) e pós-fermentado (chá pu-erh) (ENGELHARDT, 2010).

Diversas classes de compostos têm sido identificadas nos diferentes tipos de chás de *Camellia sinensis*, destacando-se os produtos do metabolismo secundário, como: terpenos (óleos essenciais, saponinas, β -caroteno) compostos fenólicos (catequinas, ácido caféico), alcalóides (cafeína, teobromina, teofilina) e vitamina C (ENGELHARDT, 2010). Por outro lado, os produtos do metabolismo primário como polissacarídeos foram pouco estudados, sendo que a maioria dos trabalhos não apresenta sua química estrutural fina, mostrando apenas sua composição monossacarídica (CHEN *et al.*, 2004; NIE *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2010).

Além disso, os compostos encontrados nos chás apresentam-se com diferentes propriedades biológicas e farmacêuticas. Estas propriedades são mostradas por vários estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo as principais: antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas, antimutagênica, anticancerígenas, antiarterosclerose, antibacteriana, antiobesidade e proteção ultravioleta para a pele (COOPER *et al.*, 2005; YANG, 2007; GONZALEZ, *et al.*, 2009).

Existem diversas técnicas de análise para determinação das estruturas químicas dos mais variados tipos de metabólitos de plantas, dentre as quais destacam-se a Ressonância Magnética Nuclear (NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*), a Espectroscopia de Massas (MS - *Mass Spectrometry*) e a Cromatografia. Com relação à cromatografia, os processos de fracionamento baseado no uso de apenas um determinado tipo de coluna é, muitas vezes, insuficiente para assegurar a completa separação de compostos em misturas complexas, como os extratos de plantas. Recentemente, metodologias multi-dimensionais têm sido desenvolvidas em cromatografia líquida e gasosa, como por exemplo, a cromatografia líquida bidimensional (2D-LC), a qual tem sido empregada de forma eficiente na separação e identificação de uma ampla variedade de compostos.

A 2D-LC consiste de duas separações cromatográficas distintas, na qual todo o efluente proveniente da primeira dimensão (primeira coluna, por exemplo) é transferido para a segunda dimensão (segunda coluna) em várias pequenas frações, sendo esta técnica conhecida como abrangente (*comprehensive 2D-LC*) e podendo ser acompanhada por detecção de massas.

Desta forma, devido à elevada importância econômica, ao crescente interesse científico em sua complexa e diversificada composição química e suas atividades biológicas, a *Camellia sinensis* se torna um importante modelo de estudo tanto para o desenvolvimento de novas metodologias de análise fitoquímica, quanto para avaliação das atividades biológicas dos compostos encontrados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICAS

As plantas medicinais foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados para o cuidado da saúde dos seres humanos, sendo, portanto, uma cultura milenar juntamente com a evolução humana, pois antes mesmo do aparecimento da escrita as pessoas já faziam o uso de plantas, ora como remédio, ora como alimento (ALMEIDA, 1993).

A partir da segunda metade do século XX, o uso de medicamentos industrializados e sintéticos começou a intensificar-se e, assim, o uso de plantas passou a ser suplantado pelos medicamentos industrializados que passaram a ter uma maior predominância nas terapias modernas (FERREIRA, 1998).

Contudo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o uso de plantas medicinais pela população mundial, ainda que reduzido, têm sido muito significativo, pois cerca de 80% da população já fez uso de algum tipo de planta com o objetivo de aliviar alguma sintomatologia. No Brasil, estima-se que das 200.000 espécies vegetais existentes, pelo menos a metade tem alguma propriedade terapêutica útil à população. Contudo, menos de 1% delas tem sido estudada adequadamente (MARTINS *et al.*, 2000).

O Brasil é proprietário da maior biodiversidade do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Este patrimônio genético tem um valor econômico estratégico inestimável em várias atividades humanas, dentro das quais o desenvolvimento de novos medicamentos é considerado como um grande potencial (LAPA *et al.*, 2003; CALIXTO, 2003). A razão desta afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de fármacos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, já que cerca de um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de plantas medicinais utilizadas na medicina popular para os mais diversos fins (CALIXTO, 2003).

Sendo assim, uma área emergente de pesquisa está voltada para desenvolvimento de análises que permitam a identificação dos compostos

presentes nas plantas medicinais, e os laboratórios que executam essas análises são chamados de laboratório de química de produtos naturais.

Produto natural é um composto químico produzido por qualquer organismo vivo encontrado na natureza. Quando apresentam algum tipo de atividade farmacológica podem ser diretamente utilizados como medicamentos, ou então utilizados como modelo para o desenvolvimento de novas drogas. Contudo, muitos desses compostos apresentam estruturas muito complexas e não podem ser sintetizados em laboratórios (EL-SHEMY *et al.*, 2007).

Dentro deste contexto, os compostos naturais produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos; e os metabólitos secundários, como compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides, que são compostos sintetizados a partir dos metabólitos primários, sendo os compostos do metabolismo secundário os principais responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, apresentando também grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresses ambientais (BALADRIN *et al.*, 1985; Di STASI, 1995).

Baseando-se na complexidade de sua composição fitoquímica, nos processamentos a que suas folhas são submetidas, alterando desta forma sua composição, e conhecendo-se também o valor econômico e científico da *Camellia sinensis*, é que surgiu o interesse em realizar investigações mais detalhadas com relação à composição química e atividade biológica dos metabólitos presentes nesta planta.

2.2 *Camellia sinensis*

2.2.1 Características botânicas da planta

A *C. sinensis* (Figura 1) é uma espécie da família Theaceae, sendo uma árvore de até 15 metros de altura. Ela é nativa das florestas do Nordeste da Índia e Sudeste da China e foi gradualmente introduzida na Índia, Sri Lanka e, então, em muitos países tropicais e subtropicais (ENGELHARDT, 2010).

Possui folhas longas, escuras, lustrosas, com nervuras bem marcadas nas superfícies e margens inteiramente denteadas. As folhas mais novas são cobertas de pequenos tricomas brancos. As flores surgem sozinhas ou aos pares entre as folhas, são pequenas com pétalas brancas, possuindo muitos estames e um pistilo com 3 estigmas. Os frutos são cápsulas pequenas e globosas, com 1 a 3 sementes também globosas, que possuem um óleo que pode ser utilizado para o consumo humano (DUARTE *et al.*, 2006).

Seu cultivo se dá preferencialmente por meio de estacas e depende de solo fértil, ácido e bem irrigado, sob sol pleno ou até mesmo ao abrigo deste. Necessita de temperatura moderada, por isso tem sido plantada em altitudes consideráveis, junto a montanhas e planaltos com até 1600 metros de altitude.



FIGURA 1 – ILUSTRAÇÃO DE UM RAMO DE *Camellia sinensis* COM **A)** SECÇÃO TRANSVERSAL DA FLOR E **B)** SEMENTES.

2.2.2 Principais formas de utilização da planta

As partes mais utilizadas da *C. sinensis* na produção dos diversos tipos de chás são as folhas e os botões, pois possuem cerca de 30% de compostos polifenólicos, os quais têm sido alvos de muitos estudos por serem indicados como os principais responsáveis pelas propriedades biológicas atribuídas à planta (SIMÕES *et al.*, 2004). Diversas são as formas de utilização da planta, que vão desde a infusão, até extratos aquosos, hidroalcoólicos, entre outros, incorporados em diferentes formas farmacêuticas e cosméticas, utilizados tanto de forma oral, quanto via tópica na forma de cremes, loções, géis e outros (ENGELHARDT, 2010).

2.3 PROCESSAMENTO DOS CHÁS DE *Camellia sinensis*

O chá verde e o chá preto são as formas mais consumidas de *C. sinensis*, sendo que o chá preto responde a cerca de 80% do consumo mundial, enquanto que o chá verde a 20%, com maior consumo na Europa e Ásia (HENDERSON *et al.*, 2002).

As diferenças entre os tipos de chás estão principalmente no processamento pós-colheita, obtido pela auto-oxidação enzimática das folhas, ocorrendo por ação das enzimas polifenol-oxidases e peroxidases presente nos vacúolos das células (TAKEO, 1992; MACKENZIE *et al.*, 2007). Recentemente uma técnica de fermentação microbiana anaeróbica tem sido empregada (OKADA *et al.*, 1996).

Existem dois métodos principais de processamento das folhas dos chás, o tradicional (ortodoxo) que é utilizado para fazer os chás a granel e o método CTC (*Crush, tear, curl* - esmagar, rasgar e enrolar) (HAMPTON, 1992) utilizado para fazer os chás em saquinhos. Estes dois métodos serão descritos em detalhes.

2.3.1 Processo ortodoxo ou tradicional

O procedimento tradicional ou ortodoxo é utilizado para fazer chá a granel, onde as folhas, dependendo do tipo de chá desejado, devem ser submetidas basicamente aos processos de: vaporização ou tratamento com calor seco, murchamento, seguido da rolagem, oxidação e secagem final (ENGELHARDT, 2010). Um esquema deste tipo de processamento está ilustrado na Figura 2.

- **Vaporização ou tratamento com calor seco:** Tem como finalidade a inativação das enzimas polifenol-oxidase (PFO) e peroxidase. As folhas são colocadas em panelas de metal, sobre vapor d'água (vaporização) ou uma chama quente (calor seco), onde se tornam maleáveis, essa súbita exposição ao calor destrói as enzimas que levariam à oxidação. Esta é a primeira etapa de preparação do chá verde.
- **Murchamento:** O objetivo do murchamento é reduzir a umidade das folhas do chá em até 70% e permitir uma leve oxidação. As folhas de chá são dispostas em bandejas no sol ou em ambientes arejados, sob fluxo de ar através das folhas, para que a umidade seja removida de uma maneira uniforme. Este processo leva entre 12 e 17 horas, até que as folhas fiquem flexíveis para o processo de rolagem.
- **Rolagem:** As folhas de chá são colocadas sobre uma mesa onde uma máquina de rolamento gira horizontalmente sobre ela. Esta ação faz com que as folhas de chá sejam esmagadas. Durante o processo de produção do chá verde a rolagem é feita com aquecimento (100 °C) para redução da umidade das folhas.
- **Oxidação:** O processo de oxidação é o que leva à diferenciação dos tipos de chás. O chá preto é totalmente oxidado; o chá oolong é parcialmente oxidado; e os chás verde e branco não são oxidados. Esta etapa é fundamental para o sabor final do chá. Para a oxidação as folhas são colocadas sobre bandejas em um quarto frio e úmido. A oxidação ocorre quando as enzimas endógenas (PFO e peroxidase) entram em

contato com o oxigênio (de 2 a 6 h). Uma vez que as folhas atingiram o nível desejado de oxidação, as folhas são secas.

- **Secagem:** É realizada no intuito de parar o processo de oxidação e reduzir o teor de umidade total para cerca de 3%, neste processo o chá é passado por secadores mecânicos com ar aquecido.

2.3.2 CTC (*Crush, Tear e Curl* - esmagar, rasgar e enrolar)

O CTC foi inventado durante a Segunda Guerra Mundial para aumentar a quantidade de chá a ser armazenado. O processo de produção segue o modo tradicional até a fase de rolagem, a qual é substituída pela técnica CTC, em que as folhas são conduzidas por uma série de rolos cilíndricos com centenas de pequenos "dentes" que cortam, rasgam e enrolam as folhas. Isso origina folhas com tamanhos muito reduzidos, ideal para fabricação de chás em saquinhos. Vale ressaltar que o método CTC não altera a qualidade das folhas do chá. Após essa etapa, as folhas seguem os mesmos processos de oxidação e secagem, conforme descrito anteriormente nesta seção (HAMPTON, 1992; ENGELHARDT, 2010).

Levando-se em consideração que o processo produtivo ao qual as folhas de *Camellia sinensis* são submetidas após a colheita leva à diferenciação dos tipos de chás, estes serão abordados separadamente com relação ao seu processamento e suas características principais.

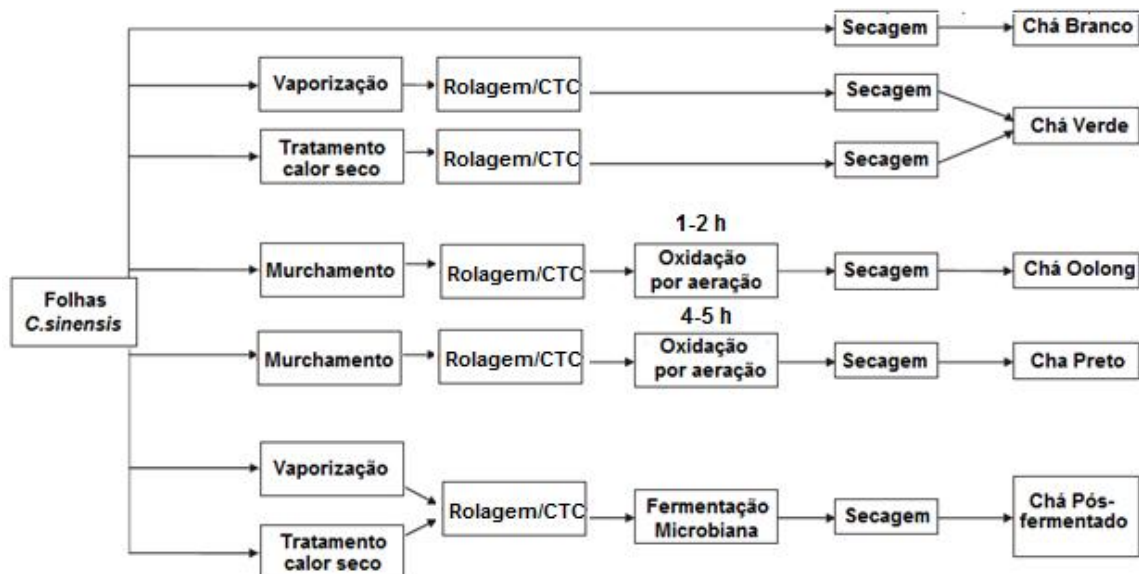


FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DOS TIPOS DE CHÁS DE *Camellia sinensis*

2.3.3 Chá branco

O chá branco é preparado a partir de folhas jovens e botões retirados antes que as flores desabrochem. Para tanto, os botões foliares estão protegidos da luz do sol, impedindo-se assim, a formação de clorofila. O processo básico para preparação do chá branco consiste apenas na secagem mecânica, corte e mistura das folhas, sendo que estas não sofrem nenhum tipo de oxidação (GONZALEZ *et al.*, 2009).

2.3.4 Chá verde

O chá verde também não é submetido ao processo de oxidação. A fim de assegurar que as folhas recém-colhidas não oxidem, elas são expostas a vapor de água (vaporização) ou tratamento com altas temperaturas (calor seco) para inativar as enzimas, e então são submetidas à etapa de rolagem, a qual ocorre em temperaturas elevadas, e por fim são secas mecanicamente com aquecimento (OWUOR, 2003; KARORI, *et al.*, 2007; ENGELHARDT, 2010).

2.3.5 Chá oolong

O chá oolong é submetido a um processo de oxidação mediana. A primeira etapa de seu processamento é o murchamento, logo em seguida passa pelo processo de rolagem, sem aquecimento, onde ocorre a liberação das enzimas polifenol-oxidase e peroxidase e, posteriormente, ocorre a etapa de oxidação. Nesta etapa, as folhas permanecem sobre grandes bandejas em local frio e úmido, por um tempo aproximado de 1 a 2 horas, onde o chá irá adquirir a sua coloração característica (escurecimento) e então as folhas são submetidas à secagem final (OWUOR, 2003; KARORI *et al.*, 2007; ENGELHARDT, 2010).

2.3.6 Chá preto

As principais etapas para a preparação do chá preto são basicamente as mesmas do chá oolong, sendo a principal diferença o aumento do tempo em que as folhas ficam submetidas ao processo de oxidação (4 a 5 h) (ENGELHARDT, 2010). Quando comparado aos demais chás provenientes da *Camellia sinensis*, o chá preto é o mais oxidado e apresenta um sabor mais forte e acentuado (BALENTINE *et al.*, 1997).

2.3.7 Chá pu-ehr (pós-fermentado)

O chá pós-fermentado é inicialmente submetido ao mesmo processamento do chá verde, no entanto é realizada uma etapa de fermentação microbiana, onde as folhas são mantidas em contato com microrganismos anaeróbicos e então submetidas aos secadores mecânicos (GONG *et al.*, 1996; OKADA *et al.*, 1996).

2.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA

Compostos fitoquímicos do metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos

nucleotídeos, dos lipídios, dos carboidratos e da clorofila. Já o metabolismo secundário origina compostos que não apresentam uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas, ou para que uma planta complete seu ciclo de vida, mas eles desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente (SIMÕES *et al.*, 2004). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (Figura 3) (SIMÕES *et al.*, 2004).

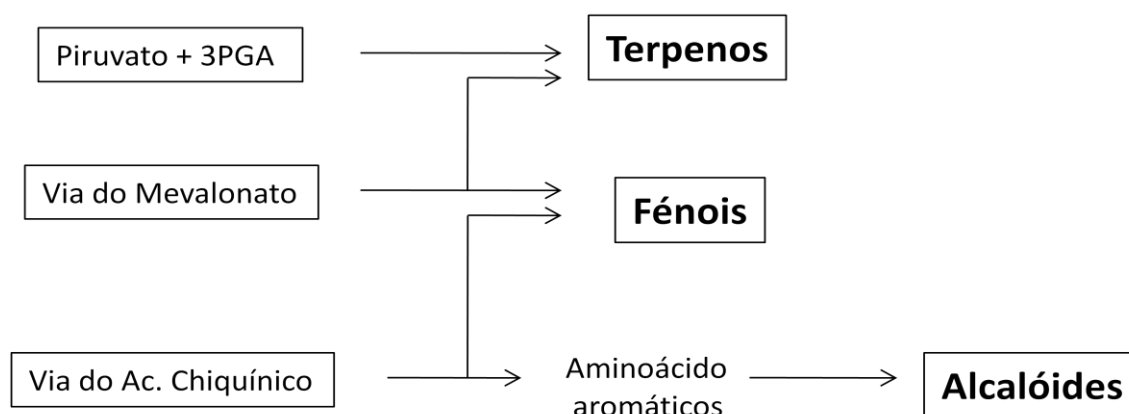


FIGURA 3 - PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO E SUAS INTERLIGAÇÕES.
FONTE: Adaptado de Perez (2011).

A composição química dos diferentes tipos de plantas varia com o clima, sazonalidade, práticas de horticultura, a variedade, a idade da folha, e o processamento a que são submetidas após colheita (LUNDER, 1989). Nas espécies utilizadas na medicina popular ou no preparo de fitoterápicos, variações nos metabólitos secundários podem determinar e/ou influenciar a eficácia do produto.

As folhas da *C. sinensis*, de modo geral, contêm proteínas, carboidratos, lipídeos, ácido ascórbico, terpenos, bases púricas (alcalóides) e principalmente compostos fenólicos (~30%), além de frações voláteis, carotenóides, tocoferóis, vitaminas (A, K, B, C), e minerais como, flúor, potássio, magnésio, ferro, manganês, fósforo, entre outros. Apresenta também alguns aminoácidos, mas a L-teanina (ácido gama-etilamina-L-glutâmico) é o mais abundante (HUANG, 1993; BRUNETON, 1995; GRUENWALD, 2000; FERRARA *et al.*, 2001, ENGELHARDT, 2010).

É sabido que durante o processo oxidativo a que as folhas de *C. sinensis* são submetidas, muitas alterações na sua composição química podem ocorrer. Assim, os principais compostos relatados na literatura para o chá verde e o chá preto serão melhor abordados.

2.4.1 Carboidratos

Os carboidratos são classificados em dois grandes grupos: os de reserva e os estruturais (AVIGAD; DEY, 1997). O amido e as frutanas são os carboidratos de reserva mais abundantes e metabolizáveis em plantas. Contudo, as plantas produzem outros polissacarídeos que também podem ser considerados de reserva, como as galactomananas, constituintes de sementes de muitos vegetais (AVIGAD; DEY, 1997).

Os carboidratos chamados de estruturais, são os compostos naturais mais abundantes na Terra, sendo a mais importante fonte de reciclagem de carbono. Estes carboidratos encontram-se principalmente nas paredes celulares, que envolvem as células vegetais (REID, 1997). A composição química da parede celular primária de dicotiledôneas é de aproximadamente 25-40% de celulose, 15-25% de hemicelulose, 15-40% de substâncias pécticas, 5-10% proteínas e traços de compostos fenólicos (AVIGAD; DEY, 1997).

A parede celular secundária encontra-se entre a primária e a membrana plasmática da célula, conferindo rigidez aos tecidos vegetais (REID, 1997). A conversão da parede primária em secundária ocorre após o processo de lignificação, o qual interrompe o crescimento celular e indica, portanto, o amadurecimento celular e a diferenciação terminal da célula (ALBERSHEIM, 1996). A constituição química deste tipo de parede, passa a ser de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e traços de pectina (AVIGAD; DEY, 1997).

As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. Os constituintes fundamentais das pectinas são o ácido poligalacturônico (PGA) e as ramnogalacturonanas tipo I (RGI). As ramnogalacturonanas tipo II constituem a terceira classe de polissacarídeos pécticos ricos em ácido galacturônico. Arabinanas, galactanas e

arabinogalactanas são frequentemente encontradas em frações pécnicas, constituindo cadeias laterais das RGI (ASPINALL, 1980; BRETT; WALDRON, 1990; CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Os (PGAs) são homopolímeros helicoidais formados por unidades de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4)-ligadas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). As (RGI) são heteropolímeros constituídos por repetições do grupo dissacarídico [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] (McNEIL *et al.*, 1984; CARPITA e GIBEAUT, 1993). As RGI e os PGAs formam os dois principais constituintes da matriz pécnica da parede celular dos vegetais superiores (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

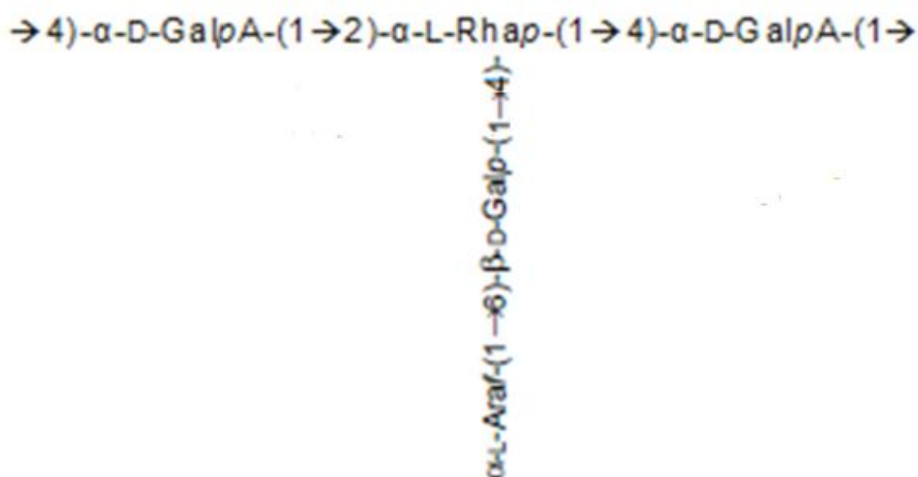
As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1980). São hemiceluloses: xilanas, glucomananas, mananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β -glucanas com ligações 1 \rightarrow 3), β -glucanas 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4 ligadas e arabinogalactanas tipo II (ASPINALL, 1980; BRETT; WALDRON, 1990). Este último tipo de polissacarídeo também pode estar presente em frações pécnicas, associado a moléculas de RGI (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Com relação à *C. sinensis*, um polissacarídeo ácido (ATPS-2) (Figura 4A) e um polissacarídeo neutro (NTPS-1) (Figura 4B) foram purificados de chá verde, com peso molecular médio de 4.400 e 21.200 Da, respectivamente. ATPS-2 apresentou ramnose, arabinose, galactose e ácido galacturônico em sua composição, e suas características estruturais foram investigadas por uma combinação de análises químicas e instrumentais, como degradação de Smith, ^1H NMR, ^{13}C NMR e NMR bidimensional, revelando que ATPS-2 tratava-se de um polissacarídeo pécnico com a cadeia principal composta por regiões de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4) ligadas, interconectadas por resíduos de ramnose. As regiões mais ramificadas apresentaram a seguinte cadeia principal: \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow), e as cadeias laterais compostas por resíduos de α -L-Araf e β -D-Galp (WANG *et al.*, 2009a, 2009b).

Em relação ao polissacarídeo neutro (NTPS-1), sua composição monossacarídica apresentou apenas galactose, sendo que sua estrutura foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa, degradação de Smith e espectroscopia de NMR (1D e 2D). O polissacarídeo

NTPS-1 foi caracterizado como sendo uma galactana constituída de unidades galactopiranosídicas β -(1 \rightarrow 4) ligadas (WANG *et al.*, 2009a, 2009b).

A



B



FIGURA 4 - ESTRUTURAS DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *C. sinensis*. EM **A**) POLISSACARÍDEO ÁCIDO (ATPS-2) E EM **B**) O POLISSACARÍDEO NEUTRO (NTPS-1).

Outros tipos de monossacarídeos já foram descritos em heteropolissacarídeos de *C. sinensis*, entre eles ribose, fucose, xilose, manose, glucose, ácido glucurônico, entre outros. (TAKEO, 1992; CHEN *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2010).

Assim como os processos de oxidação alteram os metabólitos secundários, os polissacarídeos também podem ser afetados. Sabe-se que muitas das características estruturais de um polissacarídeo são definidas pelo seu peso molecular, composição monossacarídica, a posição das ligações glicosídicas, sequência de monossacarídeos, conformação, tamanho de partícula, solubilidade e propriedades reológicas (ZHANG; WANG, 2007; CUI, 2005). Deste modo, estudos indicam que a etapa de oxidação na produção de chás oolong e preto pode induzir a alterações da estrutura dos polissacarídeos,

tais como composição monossacarídica, peso molecular e interação intermolecular, podendo alterar suas propriedades biológicas (NIE; XIE, 2011).

2.4.2 Lipídeos

Pertencem ao grupo dos lipídeos as substâncias que, em geral, são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis ou ligeiramente solúveis em água. Contêm um grande número de diferentes tipos de substâncias, incluindo ácidos graxos, acilgliceróis, fosfolipídeos, esfingolipídeos além de compostos a estes relacionados. Os triacilgliceróis são os lipídeos mais comuns em alimentos, formados exclusivamente por produtos de condensação entre glicerol e ácidos graxos, usualmente conhecidos como óleos ou gorduras (AMABIS, 1994)

Nas plantas os lipídeos podem ocorrer em forma de óleos ou gorduras se estes forem para armazenamento. Nos tecidos fotossintetizantes são comumente encontrados glicolipídeos, tais como monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) e sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) (Figura 5) (CHAPMAN; BARBER, 1987; SASSAKI *et al.*, 2001b).

De acordo com Mahanta (1988), a quantidade total de lipídeos na infusão de *C. sinensis* é aproximadamente 4% e durante a manufatura do chá preto há uma mudança na sua composição. No processo oxidativo ocorre uma perda de ácido linolênico, como também dos ácidos linoléico e palmítico em menores quantidades. Além da alteração nos ácidos graxos, também foi observado alteração no conteúdo dos glicolipídeos MGDG, DGDG, cerebrosídeo e dos fosfolipídeos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol), sendo observado um decréscimo de 27-90% nas folhas processadas (WRIGHT; FISHWICK, 1979).

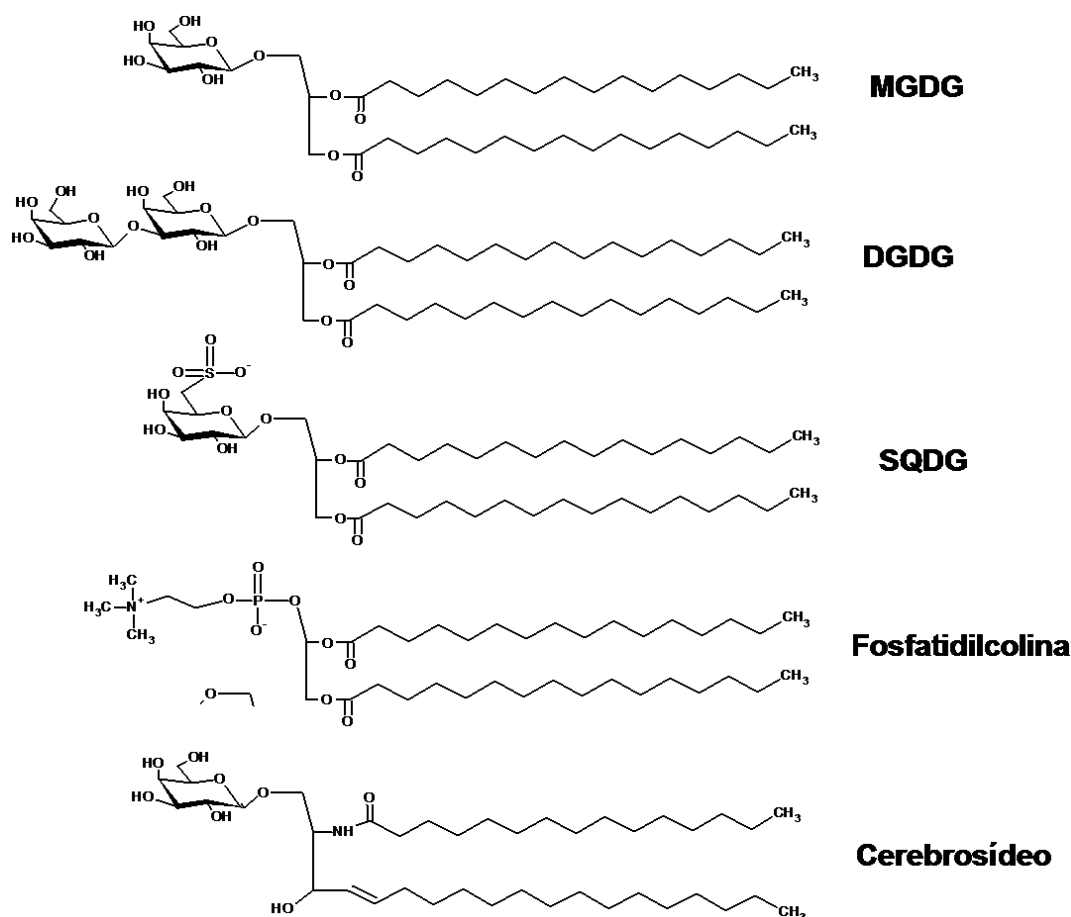


FIGURA 5- PRINCIPAIS LIPÍDEOS ENCONTRADOS EM *C. sinensis*.

2.4.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem no mínimo um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Estes grupos podem ser substituídos por éteres metílicos, ácidos cinâmicos, carboidratos, entre outros. São amplamente distribuídos em plantas como produtos do metabolismo secundário. Uma grande variedade de monossacarídeos como a glucose, galactose, xilose, arabinose e ramnose podem estar ligados por meio de ligações O- ou C-glicosídicas, aumentando a variedade química dos compostos fenólicos (PICCIN, 2004; SOUZA, *et al.*, 2008a)

Uma das formas de se classificar os compostos fenólicos é quanto a sua cadeia carbônica principal. Segundo esta classificação existem 4 classes principais: ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico), ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ferrúlico e *p*-coumárico), cumarinas (cumarina) e flavonóides

(catequinas, quercetina, etc) (ESCARPA; GONZÁLES, 2001; MACHEIX *et al.*, 1990).

Os flavonóides são os compostos fenólicos mais comumente encontrados no reino vegetal, eles são caracterizados por apresentarem três anéis fundidos como unidade estrutural básica. Estes anéis estão nomeados com as letras A, B e C (Figura 6).

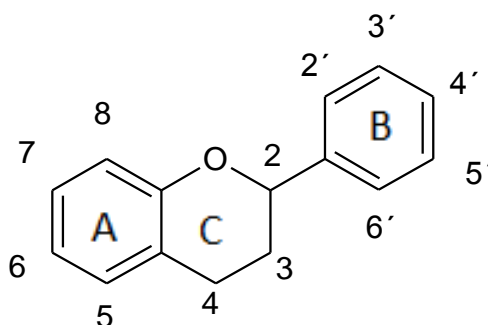


FIGURA 6- ESTRUTURA BÁSICA DE FLAVONÓIDES.

Segundo a estrutura química, os flavonóides podem ainda ser subdivididos nas seguintes subclasses (AHERNE; O'BRIEN, 2002) (Figura 7):

- Flavanol (flavan-3-ol): catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina galato, etc;
- Antocianidina: cianidina e delphinidina;
- Flavanona: hesperetina e naringenina
- Flavanonol (dihidroflavonol): dihidroquercetina, dihidromiricetina e dihidrocaempferol;
- Flavona: apigenina e luteonina;
- Isoflavona: ginisteína e gliciteína.
- Flavonol: quercetina, miricetina, caempferol e isoraminetina

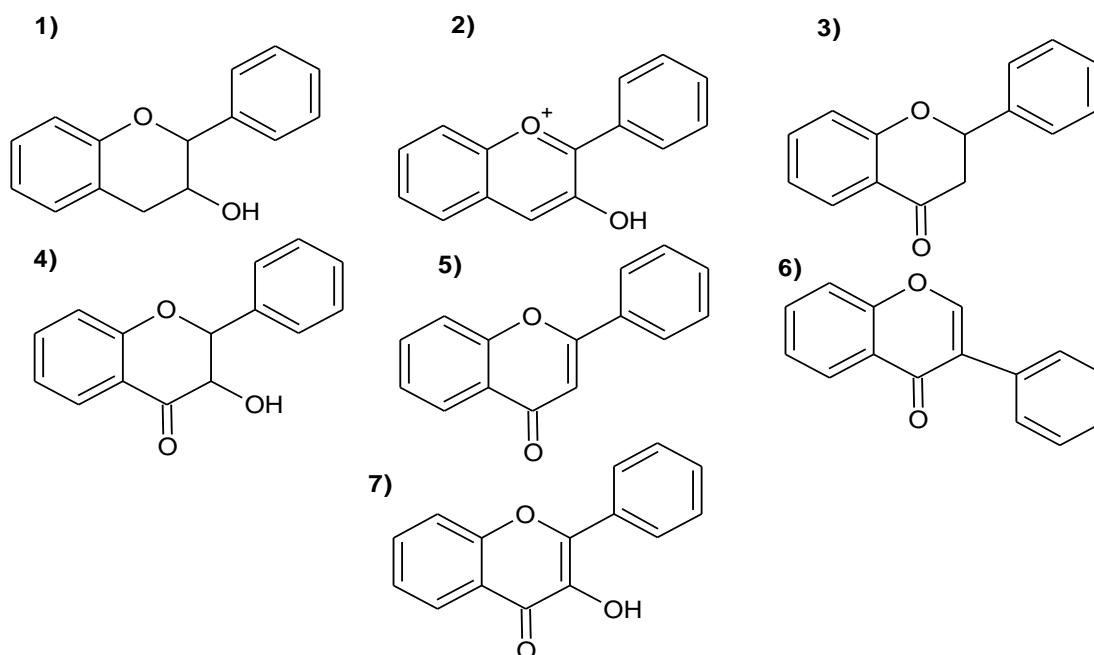


FIGURA 7 - SUBCLASSES DOS FLAVONÓIDES. 1) FLAVANOL; 2) ANTOCIANIDINA, 3) FLAVANONA, 4) FLAVANONOL, 5) FLAVONA, 6) ISOFLAVONA E 7) FLAVONOL.

Na literatura encontra-se um grande número de publicações acerca da composição fenólica dos chás de *C. sinensis*. O destaque no chá verde são os flavanóis ou catequinas (Figura 8) e no chá preto as teaflavinas (Figura 9), formadas pela condensação de catequinas. No chá verde, as catequinas podem chegar a 75% do conteúdo de flavonóides, enquanto no chá preto elas representam somente 20 a 30%. Além disso, eles podem influenciar o sabor da bebida, podendo servir como um indicativo da qualidade do produto. Podem ocorrer reações químicas conhecidas como epimerização durante o processamento ou preparação dos chás, transformando as catequinas majoritárias em seus isômeros (WANG *et al.*, 2000).

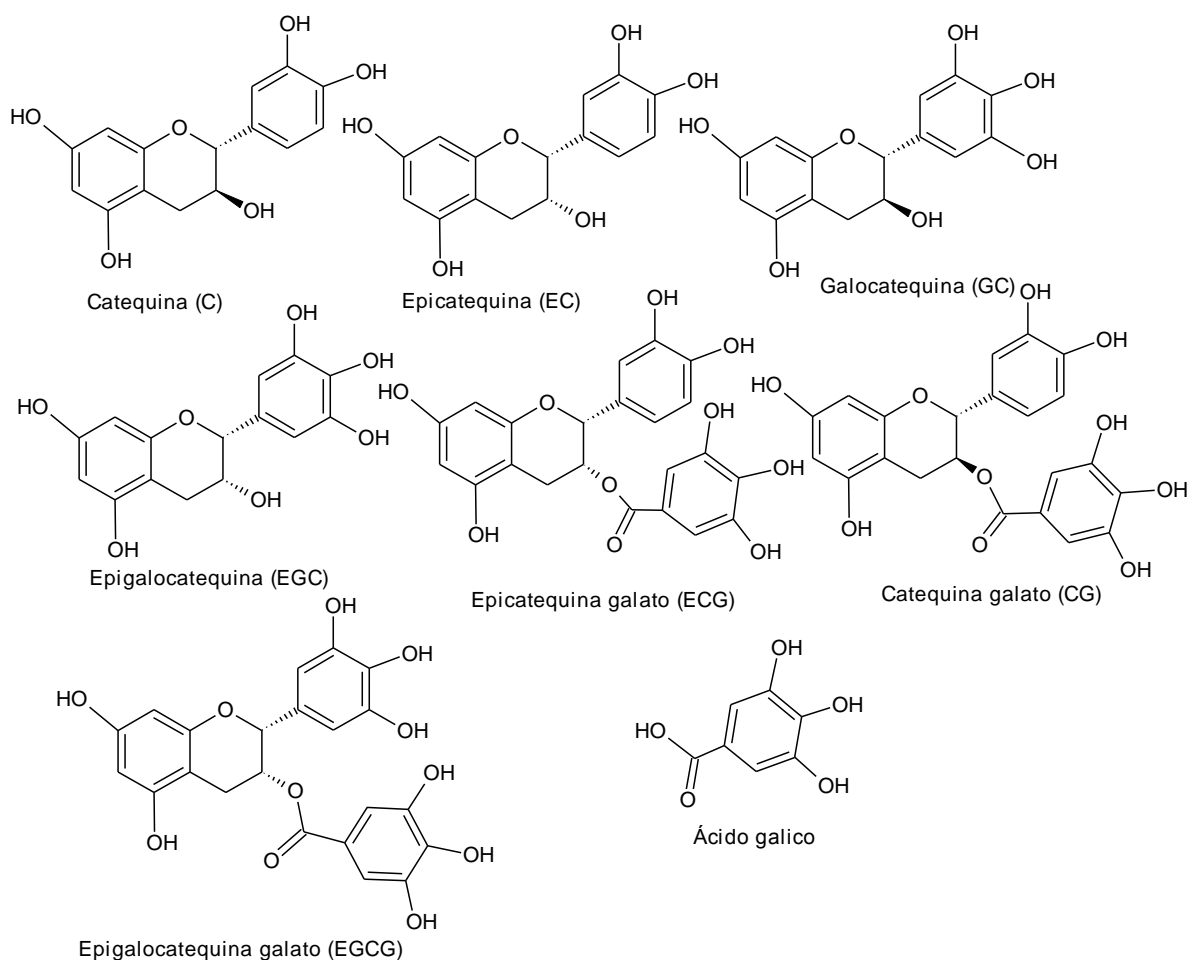


FIGURA 8 - PRINCIPAIS FLAVONÓIS/CATEQUINAS PRESENTES NOS CHÁS.

Embora o conteúdo total de polifenóis dos chás verde e preto seja semelhante, os tipos de flavonóides presentes neles são diferentes, devido ao processamento desses chás, que levam à formação de estruturas provenientes da oxidação a que são submetidos (ENGELHARDT, 2010).

Desta forma, as catequinas são modificadas durante o processo de oxidação (chá preto) dando origem às teaflavinas, bisflavanóis e ácidos epiteaflavílicos, que sofrem posterior oxidação levando a formação das tearubiginas. Na composição do chá preto predominam quatro teaflavinas: teaflavina simples (TF), teaflavina-3-galato (TF-3-G), teaflavina-3'-galato (TF-3'-G) e teaflavina-3,3'-digalato (TF-3,3'-dG) (Figura 9), além de outras teaflavinas menos abundantes (DAVIES *et al.*, 1992). As várias teaflavinas, juntamente com as tearubiginas, produzidas por dimerização oxidativa catalisadas pelas enzimas polifenol-oxidase (PFO) e peroxidase, contribuem para cor e sabor únicos do chá preto (SHARMA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2000).

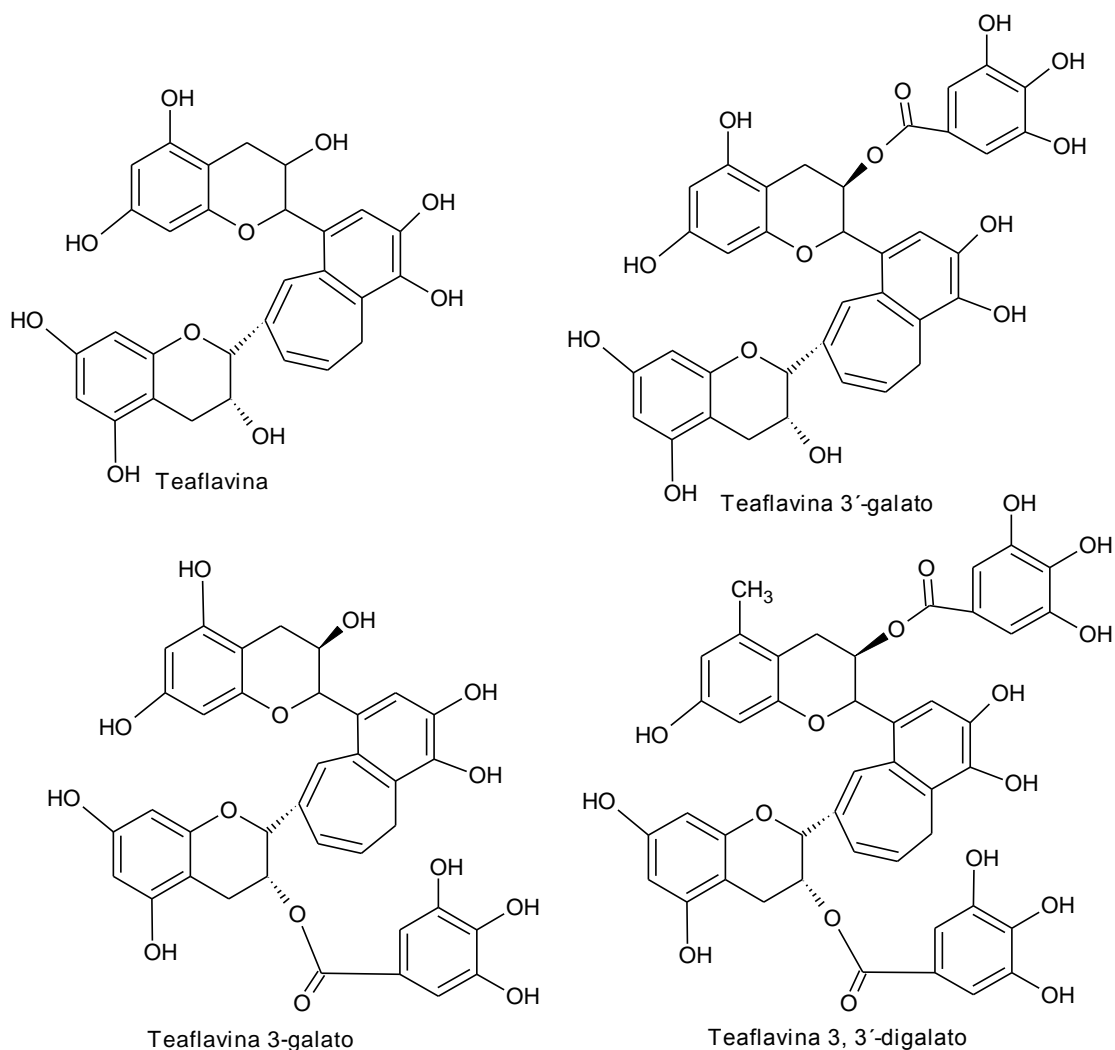


FIGURA 9 - PRINCIPAIS TEAFLAVINAS PRESENTES NO CHÁ PRETO.

Além das catequinas, as folhas frescas e processadas (chás verde e preto) contêm ainda quantidade significativa de flavonóis (miricetina, quercetina e caempferol) e flavonas (apigenina) e seus glicosídeos correspondentes, podendo ser mono-, di-, tri- e tetraglicosilados, os quais podem conter ainda ésteres de acetato ou ácidos cinâmicos ligados. Tipicamente as ligações entre os carboidratos e flavonóis ocorrem em uma das hidroxilas (tipicamente na posição O-3), mas nas flavonas a ligação encontra-se no C-6 ou C-8 da aglicona, e não no oxigênio (KHAN; MUKHTAR, 2007, LIN *et al.*, 2008) (Figura 10).

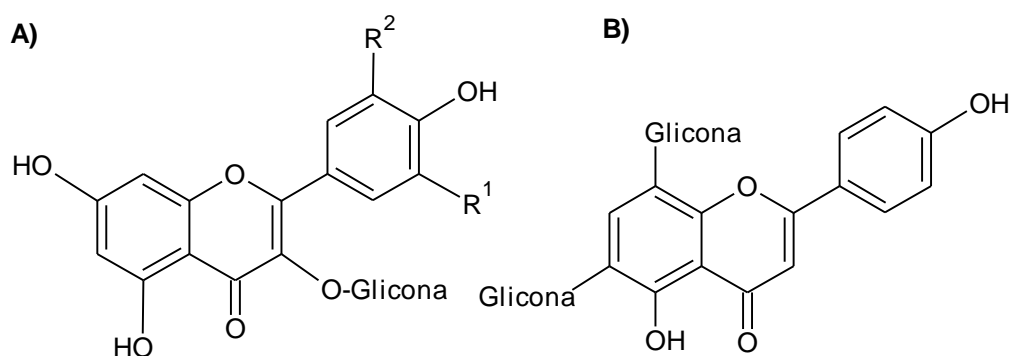


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO DE **A)** FLAVONOL GLICOSÍDEO: CAEMPFEROL: $R^1=R^2=H$; QUERCETINA: $R^1=H$, $R^2=OH$; MIRICETINA: $R^1=R^2=OH$. E **B)** FLAVONA GLICOSÍDEO. A GLICONA É CONSTITUÍDA PRINCIPALMENTE DE GLUCOSE E GALACTOSE E ÉSTERES DE ACETATO OU ÁCIDO CINÂMICO.

Outros compostos presentes no chá verde em maior quantidade do que no chá preto são os taninos (CAVALCANTI *et al.*, 2010). Classicamente, segundo sua estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato (HELDT, 1997), como por exemplo, a strictinina (Figura 11 A). Largamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros dos flavanóis (HELDT, 1997) (Figura 11). Quando são ligados via C4-C8 ou C4-C6, originam-se as proantocianidinas Tipo B (Figura 9, B), se uma ligação éter extra ocorre entre C3 e C7, são denominadas Tipo A (Figura 11, C) (SOUZA *et al.*, 2008b)

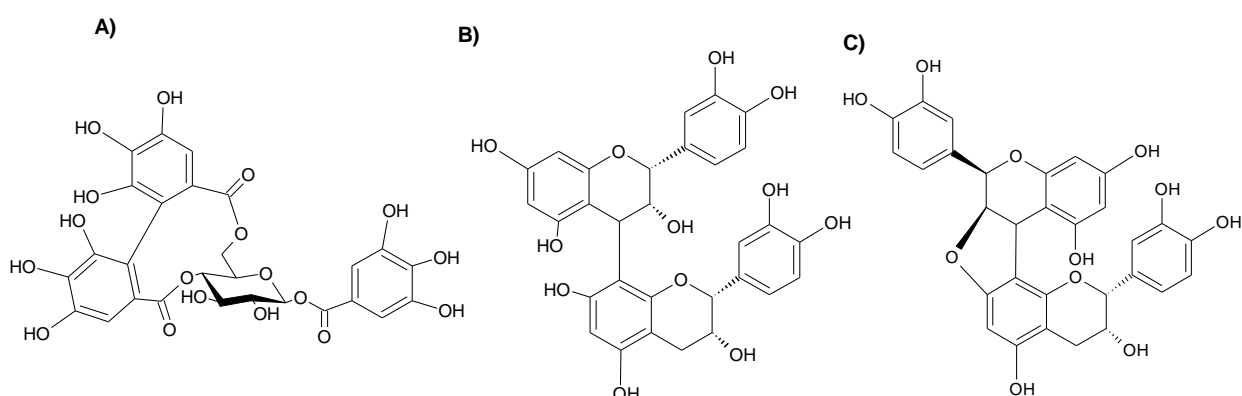


FIGURA 11- EXEMPLOS DE TANINOS HIDROSILÁVEIS: **A)** STRICTININA; E CONDENSADOS: **B)** PROANTOCIANIDINA TIPO B E **C)** PROANTOCIANIDINA TIPO A.

2.4.4 Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel. Tal característica indica de certa forma sua origem química. Desse modo, quase a totalidade dos alcalóides é derivada de aminoácidos, como a ornitina, a lisina, a tirosina e o triptofano. Enquanto a ornitina é precursora dos alcalóides pirrolidínicos (nicotina) e tropânicos (cocaína), a lisina dá origem aos alcalóides piperidínicos (coniína), a tirosina e o triptofano são formados na via do ácido chiquímico e dão origem aos alcalóides isoquinolínicos, como a morfina e codeína e indólicos, como a estricnina (SIMÕES, 2004).

Alguns alcalóides não são derivados diretamente de aminoácidos e sim de uma base nitrogenada. Esse é o caso da cafeína (1,3,7-trimetilxantina), uma xantina produzida a partir de uma purina. Contudo, as purinas por sua vez derivam de aminoácidos tais como glicina, ácido L-aspártico e L-glutamina. A cafeína e seu precursor teobromina são produzidas por mais de 60 espécies subtropicais, incluindo o café (*Coffea arabica*), o chá (*C. sinensis*), o mate (*Ilex paraguayensis*), o guaraná (*Paullinia cupana*), a cola (*Cola nitida*) e o cacau (*Theobroma cacao*) (ASHIHARA *et al.*, 1996; SIMÕES, 2004).

Os principais alcalóides de purina presentes nos chás verde e preto, teofilina (1,3-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e cafeína (1,3,7-trimetilxantina), estão ilustrados na Figura 12 (DEL RIO *et al.*, 2004).

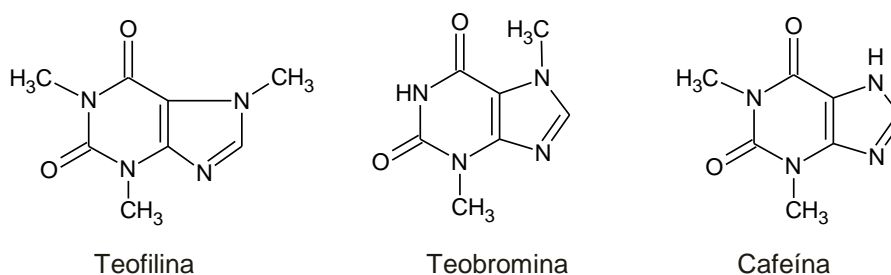


FIGURA 12 - EXEMPLOS DE ALCALÓIDES DO CHÁ VERDE E PRETO.

2.4.5 Terpenos

Os terpenos são divididos em mono, di, tri e tetraterpenos e os poliisoprenos (sesquiterpenos) (Figura 13). Estudos demonstram que os

compostos monoterpénoides (óleos essenciais) podem atuar como verdadeiros agentes antitumorais em diversos tipos de células (BAKKALI *et al.*, 2008).

Yanagimoto *et al.* (2003), analisaram as propriedades antioxidantes de extratos voláteis (monoterpenos) de chá verde, oolong e preto. Os compostos voláteis estudados foram caracterizados por GC-MS, sendo que os presentes nos três tipos de chás estudados foram: hexanal, 2-pentenal, 2-hexenal, 4-heptenal, 1-penten-3-ol, 1-pentanol, álcool benzílico, *N*-etilpirrol-2-carboxalaldeído e indol. Os compostos voláteis que apresentaram maior atividade antioxidante foram 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol para o chá verde, furfural para o chá de oolong e álcool benzílico para o chá preto.

Schuh e Schieberle (2006) compararam os compostos voláteis presentes em infusão feita com o chá verde, com os voláteis obtidos da infusão do chá preto. Na análise comparativa observou-se que o infuso do chá verde continha um total de 42 compostos, enquanto para o preto, apenas 24, deste modo, durante o processamento da bebida para consumo (infusão) uma grande quantidade de compostos voláteis é perdida.

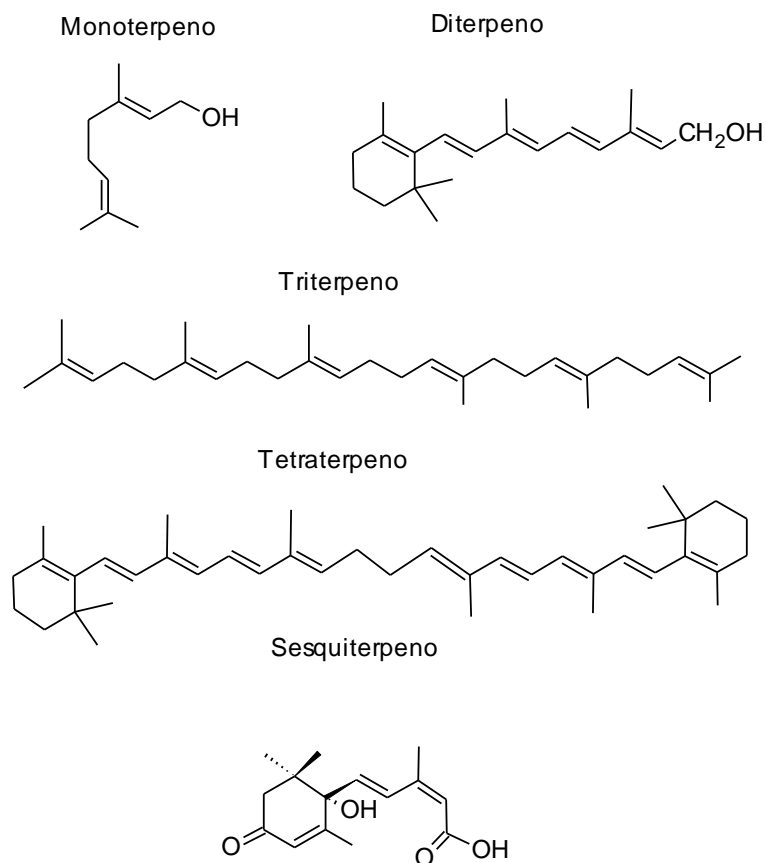


FIGURA 13 - EXEMPLOS DE CADA CLASSE DE TERPENOS.

Outro grupo de terpenóides encontrados nas plantas são as saponinas, constituídas de um núcleo triterpenoidal pentacíclico, ao qual encontram-se ligados mono- e/ou oligossacarídeos. Diversas saponinas já foram encontradas em *Camellia sinensis*, como é possível observar no trabalho realizado por Matsuy *et al.* (2009), onde todas as saponinas identificadas em outros trabalhos com extratos de folhas do chá verde de *C. sinensis* (Figura 14) foram analisadas com relação a suas atividades anti-hipercolesterolêmicas.

Saponinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Peso Molecular	Fórmula Molecular
Teasaponina B1	(E)-Cin	Ac	H	Ac	Xil	1306	C ₆₅ H ₉₄ O ₂₇
Assamsaponina J	Ac	(E)-Cin	H	Ac	Ram	1320	C ₆₆ H ₉₆ O ₂₇
Isoteasaponina B1	(Z)-Cin	Ac	H	Ac	Xil	1306	C ₆₅ H ₉₄ O ₂₇
Foliateasaponina V	(E)-Cin	H	Ac	H	Xil	1264	C ₆₃ H ₉₂ O ₂₆
Isoteasaponina B2	Ac	(E)-Cin	H	H	Xil	1264	C ₆₃ H ₉₂ O ₂₆
Isoteasaponina B3	Ang	(E)-Cin	H	H	Xil	1304	C ₆₆ H ₉₆ O ₂₆
Foliateasaponina I	Tig	Ac	H	Ac	Xil	1258	C ₆₁ H ₉₄ O ₂₇
Foliateasaponina II	(E)-Cin	Ac	H	H	Xil	1264	C ₆₃ H ₉₂ O ₂₆
Foliateasaponina III	Ang	Ac	H	Ac	Xil	1258	C ₆₁ H ₉₄ O ₂₇
Foliateasaponina IV	(Z)-Cin	Ac	H	Ac	Xil	1306	C ₆₅ H ₉₄ O ₂₇
Florateasaponina A	Ang	Ac	H	H	Xil	1216	C ₅₉ H ₉₂ O ₂₆

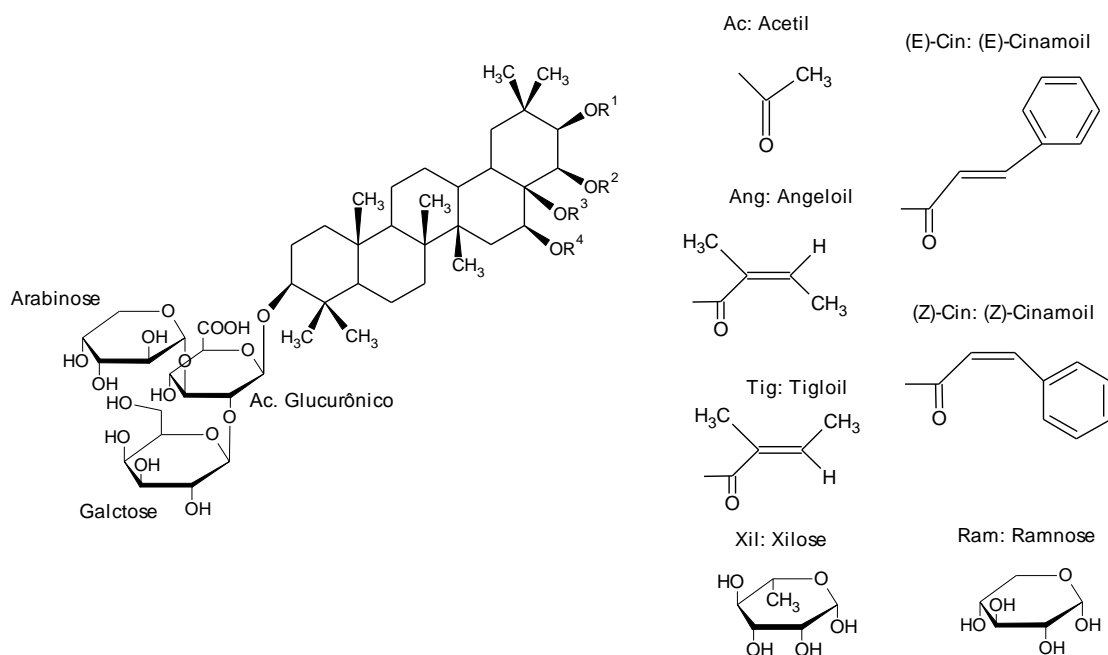


FIGURA 14 - ESTRUTURAS CONHECIDAS DE SAPONINAS DE FOLHAS DE *C. sinensis*.

FONTE: Matsuy *et al.*, 2009.

2.5 ANÁLISE DE COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR: TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Na elucidação da estrutura de compostos de baixa massa molecular, as técnicas mais empregadas são a ressonância magnética nuclear (NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), ou mais recentemente a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, sendo estas últimas acopladas ou não ao espectrômetro de massas (HPLC-MS ou UHPLC-MS) (NOVAKOVA *et al.*, 2010; PONGSUWAN, 2008; SPACIL *et al.*, 2010; GUILLARME *et al.*, 2010).

Na Cromatografia, mesmo com as técnicas modernas, o uso de apenas um tipo de coluna cromatográfica nos processos de fracionamento muitas vezes não é suficiente para assegurar a completa separação de compostos em misturas complexas, como os extratos de *C. sinensis*. Recentemente, metodologias multidimensionais têm sido desenvolvidas em cromatografia líquida (LC), como por exemplo, LC-bidimensional (2D-LC), a qual tem sido empregada de forma eficiente na separação e identificação de uma ampla variedade de compostos.

Técnicas de cromatografia multidimensional são caracterizadas por apresentarem um poder de resolução muito maior em comparação com métodos unidimensionais. Em particular, as técnicas de cromatografia líquida oferecem uma grande variedade de mecanismos de separação, como fase normal (NP - *Normal Phase*), fase reversa (RP – *Reversed Phase*), por exclusão de tamanho (SEC – *Size Exclusion Chromatography*), de troca iônica (IEX – *Ion Exchange*) ou cromatografia de afinidade (AC – *Afinity Chromatography*), caracterizados por diferentes seletividades. Consequentemente a cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) pode ser empregada em vários tipos de combinações, gerando um aumento da capacidade, seletividade e resolução dos picos, especialmente no modo abrangente (DUGO *et al.*, 2008).

Para que uma técnica cromatográfica multidimensional seja considerada abrangente, todo o efluente da primeira dimensão ou uma parte suficientemente representativa do mesmo deverá ser introduzida na segunda dimensão,

mantendo as características da separação ocorrida na primeira dimensão (primeira coluna). Se apenas algumas regiões da primeira dimensão forem introduzidas na segunda, a técnica é denominada *heart-cutting* sendo uma técnica não abrangente.

De todas as abordagens de LC x LC, a combinação de NP (*Normal Phase*) e RP (*Reversed Phase*) é provavelmente a mais ortogonal (independente) e eficiente, mas também uma das mais difíceis de realizar. Por esta razão, apenas algumas aplicações NP-LC x RP-LC foram publicadas. No entanto, o uso combinado de fase normal e reversa em duas dimensões de modo abrangente pode ser muito útil na separação de misturas complexas. O principal problema na interface da fase normal e da fase reversa é a imiscibilidade da fase móvel, que pode causar picos largos e distorcidos, assim como impossibilitar sua realização (STOLL *et al.*, 2005, DUGO *et al.*, 2004).

Uma abordagem empregada para minimizar o efeito do solvente é a utilização de uma separação cromatográfica baseada em modo *offline*, onde as frações da primeira dimensão são coletadas em pequenos tubos, ou viais, secas, e então re-injetas na segunda dimensão. Uma desvantagem de tal técnica é o maior tempo gasto na realização dessas etapas (DUGO *et al.*, 2008).

Outra abordagem menos complexa, devido principalmente a não interferência do solvente, são as técnicas RP x RP, que têm sido desenvolvidas e aplicadas para determinação de antioxidantes (BLAHOVA *et al.*, 2006; CACCIOLA *et al.*, 2006; CACCIOLA *et al.*, 2007; KIVILOMPOLO *et al.*, 2007), análise de compostos naturais, medicamentos (CHEN *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2005), explosivos (KOHNE *et al.*, 1998), aminas aromáticas e não-aromáticas (VENKATRAMANI *et al.*, 2003), drogas (VENKATRAMANI 2006), compostos aromáticos (IKEGAMI *et al.*, 2006) hidrocarbonetos e derivados de benzeno (TANAKA *et al.*, 2004), fenóis (KOHNE; WELSCH, 1999), extratos de plantas (KIVILOMPOLO; HYOTYLAINEN, 2007), ácido indol-3-acético e derivados (STOOL *et al.*, 2006) e ácidos orgânicos (POL *et al.*, 2006). Desta forma, a 2D-LC apresenta-se como uma técnica promissora, sendo que o desenvolvimento de novas metodologias de análise é de grande interesse para aplicações futuras nos mais diversos fins.

2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELATADAS EM *C.sinensis*

Considerando que a *C. sinensis* possui uma grande variedade de compostos, inúmeras atividades biológicas já foram relatadas. Os compostos do metabolismo primário, como os carboidratos, por exemplo, apresentam como principais atividades biológicas a hipoglicemiante e antiaderente seletiva contra certas bactérias patogênicas (TAKEO; KINUGASA, 1992; LEE *et al.*, 2006). Já os compostos do metabolismo secundário, são os responsáveis pela maior parte das propriedades biológicas relatadas em plantas. Dentro deste contexto, destacam-se os compostos fenólicos, que apresentam como principais atividades: antioxidante, antimutagênica, anticancerígena, anti-inflamatória, antiobesidade, hipocolesterêmica e proteção ultra-violeta para pele (COOPER *et al.*, 2005; YANG, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2009)

Uma outra classe de compostos que apresentam diversas propriedades farmacológicas são os terpenos, onde destacam-se os monoterpenos, que apresentam atividades antioxidante, citotóxica e capacidade antimutagênica, e também as saponinas que apresentam diversas atividades biológicas, entre elas: hemolítica, moluscicida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasítica, antiviral, antitumoral e hipocolesterolêmica (SPARG *et al.*, 2004).

Contudo, sabe-se que o processamento dos tipos de chás altera a estrutura de alguns compostos e esta alteração reflete em mudanças das propriedades químicas e biológicas, que são observadas principalmente nos chás verde e preto (GONZALEZ *et al.*, 2009). Desta forma torna-se de grande interesse a avaliação das atividades biológicas relacionadas aos compostos encontrados em *C. sinensis* submetidos à diferentes tipos de processamentos.

3 JUSTIFICATIVA

Os metabólitos de plantas têm sido alvos de inúmeras pesquisas, principalmente devido às suas propriedades farmacológicas, além disso, considerando a complexidade dos extratos vegetais, emerge uma área da pesquisa voltada para desenvolvimento de análises que permitam a identificação desses compostos presentes nas plantas medicinais.

A *Camellia sinensis*, em particular, apresenta um elevado e crescente interesse tanto cultural, quanto econômico devido à grande complexidade de sua composição química e suas respectivas atividades biológicas, sendo um bom modelo para o desenvolvimento de técnicas de análises. Além disso, esta planta tem uma diversificação em seu processamento pós-colheita para obtenção dos diversos tipos de chás atualmente disponíveis no mercado (verde, preto, branco, oolong, pu-ehr), sendo de grande interesse um estudo comparativo de seus metabólitos.

Considerando que não há na literatura uma detalhada caracterização dos polissacarídeos presentes em extratos de *C. sinensis*, a determinação da química estrutural, associada à avaliação de suas propriedades biológicas, torna-se um bom campo de pesquisa. Além disso, por apresentar grande complexidade em sua composição, principalmente com relação aos compostos de baixa massa molecular, esta planta pode ser utilizada no desenvolvimento de novas metodologias de análises fitoquímicas.

Desta forma torna-se de grande interesse um estudo aprofundado dos compostos presentes em *C. sinensis*, bem como a avaliação de suas atividades biológicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a identificação, caracterização e comparação de polissacarídeos presentes em dois tipos de chá de *C. sinensis*, o chá verde e o chá preto, além do desenvolvimento de metodologia cromatográfica bidimensional abrangente para determinação de compostos de baixa massa molecular e a avaliação de atividades biológicas dos compostos estudados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Submeter as folhas do chá verde e chá preto a extrações hidroalcoólica e aquosa;
- ✓ Determinar a composição de polissacarídeos presentes no extrato aquoso por técnicas de espectroscopia de NMR de ^1H e ^{13}C , cromatografia de gel permeação (GPC) e de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) e compará-los entre os dois tipos de chás;
- ✓ Avaliar a atividade antissepse dos polissacarídeos fracionados por congelamento e degelo;
- ✓ Isolar e identificar os compostos de baixa massa molecular, obtidos por meio da extração hidroalcoólica, pela aplicação da técnica de cromatografia líquida bidimensional, utilizando como primeira dimensão uma coluna de exclusão por tamanho (SEC) em HPLC e como segunda dimensão, uma coluna de fase reversa (RP-C18) no equipamento de UHPLC-PDA;
- ✓ Caracterizar a estrutura química fina das moléculas identificadas por meio do acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas;
- ✓ Avaliar a atividade antiúlcera gástrica dos extratos hidroalcoólicos;
- ✓ Comparar os resultados obtidos para os dois tipos de chás analisados (verde e preto).

5 METODOLOGIA

5.1 OBTENÇÃO DOS CHÁS VERDE E PRETO

As folhas secas de chá verde e preto foram obtidas de marcas comerciais encontradas em um mercado local na cidade de Curitiba-PR-Brasil, ambos produzidos em São Miguel Arcanjo-SP-Brasil.

5.2 EXTRAÇÕES

5.2.1 Extração Aquosa

100 g de cada chá (verde e preto) foram submetidas a extração aquosa (500 ml), sob refluxo por 2 horas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após o tempo de extração, o material foi filtrado e os extratos combinados e concentrados em evaporador rotatório com pressão reduzida, até pequeno volume, sendo em seguida liofilizados. Foram obtidos, assim, os extratos brutos (**V-Brt** e **P-Brt**) e os resíduos (**V-Res** e **P-Res**), sendo estes últimos armazenados em freezer.

Em seguida, os extratos brutos (**V-Brt** e **P-Brt**) foram tratados com etanol (3 volumes), centrifugados a 8000 rpm, obtendo-se então 2 frações, as frações precipitadas em etanol (**V-Ppt-Et** e **P-Ppt-Et**) as quais foram liofilizadas e armazenadas para posterior análise estrutural, e as frações solúveis em etanol (**V-Sol-Et**, **P-Sol-Et**), que foram concentradas até pequenos volumes (~50 ml), liofilizadas e armazenadas em freezer.

As frações precipitadas (**V-Ppt-Et** e **P-Ppt-Et**) foram ressuspensas em água e dialisadas contra água corrente em membranas de 12-14 kDa de limites de exclusão (Spectra/Por®), por 24 horas. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e armazenadas.

5.2.2 Extração Hidroalcoólica

Folhas (100 g) de cada chá foram submetidas a extração hidroalcoólica, em 500 ml de solução de etanol 70% (v/v), sob refluxo por 2 horas (3 x). Os extratos foram filtrados, concentrados em evaporador rotativo obtendo-se assim os extratos brutos (**V-Et70** e **P-Et70**), que foram liofilizados e armazenados em freezer para posterior análise.

5.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

5.3.1 Separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações insolúveis em etanol (**V-Ppt-Et** e **P-Ppt-Et**) foram fracionadas pelo processo de congelamento e degelo. Cada fração foi solubilizada em água destilada e a seguir submetida ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. O material insolúvel em água fria (**V-Ins-GD** e **P-Ins-GD**) foi separado dos demais componentes solúveis (**V-Sol-GD** e **P-Sol-GD**) por centrifugação (8000 rpm, 15 min, 25 °C) (GORIN; IACOMINI, 1984).

5.3.2 Fracionamento dos extratos hidroalcoólicos por partição líquido-líquido

Os extratos hidroalcoólicos **V-Et70** e **P-Et70** de ambos os chás (500 mg) foram solubilizados em 100 ml de água e então foram submetidos a particionamento líquido-líquido com os seguintes solventes (100 ml cada): clorofórmio, acetato de etila e butanol em ordem crescente de polaridade. Desta forma obtiveram-se as frações **V-CHCl₃**, **V-AcEt**, **V-BuOH**, **V-Aq**, para o chá verde, e **P-CHCl₃**, **P-AcEt**, **P-BuOH** e **P-Aq**, para o chá preto. Estas frações foram secas em evaporador rotativo e então armazenadas para análises posteriores.

5.4 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS

5.4.1 Hidrólise ácida total

Uma alíquota (2 mg) de cada fração solúvel no congelamento e degelo (**V-Sol-GD e P-Sol-GD**) foi tratada com 500 µl de TFA 2 M (ácido trifluoroacético) por 8 horas em estufa a 100 °C. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação a temperatura ambiente sob fluxo de N₂. Os produtos de hidrólise foram levados a redução e acetilação como explicado a seguir.

5.4.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os monossacarídeos obtidos por hidrólise foram reduzidos com NaBH₄ (borohidreto de sódio), pH 9-10, por no mínimo 4 horas (WOLFRON, 1963a). Após este período, as amostras foram tratadas com resina catiônica, para eliminar o sódio, levadas à secura sob fluxo de N₂ e lavadas com metanol (3 x) para co-evaporação do borato, sob fluxo de N₂. Os alditóis formados foram acetilados em 400 µl de anidrido-acético (Ac₂O) e piridina (1:1, v/v) por 14 hs (WOLFRON, THOMPSON, 1963a) a temperatura ambiente, formando os acetatos de alditóis, os quais foram extraídos com clorofórmio. Os reagentes foram removidos da fase de clorofórmio por sucessivas lavagens com solução aquosa de sulfato de cobre 5% (v/v). Após, foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção de água residual, e a amostra deixada secar em temperatura ambiente (~25 °C). Após secura, os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).

5.4.3 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácidos urônicos totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em 400 µL das frações **V-Sol-GD** e **P-Sol-GD** (0,1 mg/ml) foram adicionados 40 µL de uma solução de

ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6), e 2,4 ml de solução de tetraborato de sódio 75 mM, em H₂SO₄ concentrado. Após aquecimento em banho-maria fervente (100 °C) por 20 min, esta mistura foi resfriada e foram adicionados 80 µL da solução de *m*-hidroxi-bifenil a 0,15% em NaOH 0,5% para a produção do complexo colorido.

A coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi imediatamente lida em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido galacturônico (Sigma) dentro da sensibilidade do método (0,97 a 38,8 µg de ácido urônico).

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 Cromatografia em camada delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*)

As frações (**V-Sol-GD** e **P-Sol-GD**) foram hidrolisadas e analisadas inicialmente por meio de cromatografia em camada delgada para observar a composição monossacarídica, assim como as demais frações obtidas das purificações. O perfil cromatográfico foi comparado com açúcares padrões: glucose (Glc), galactose (Gal), arabinose (Ara), ramnose (Rha), ácido galacturônico (GalA) e ácido glucurônico (GlcA).

As análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), com 8 cm de altura total (7 cm a partir da origem). Como fase móvel foi utilizado EtOAc-*n*-PrOH-AcOH-H₂O (9:2,3:1:1, v/v). Para a visualização das bandas utilizou-se o revelador orcinol-H₂SO₄ a 100 °C (SKIPSKI, 1975).

5.5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS - *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

Os açúcares, já devidamente convertidos em seus respectivos derivados voláteis (acetatos de alditóis) foram analisados em cromatógrafo a gás, da marca Varian (Palo Alto, CA), modelo Saturn 2000R. A detecção por massas foi feita por ionização eletrônica (70 eV) e analisador do tipo *Ion Trap*. A coluna utilizada na separação dos componentes foi a coluna capilar DB-225-MS. Hélio

(5.0 analítico) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 ml.min^{-1} . A programação de temperatura foi: temperatura do injetor igual a $250 \text{ }^\circ\text{C}$; temperatura inicial do cromatógrafo de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ mantida por 1 min e aumentada para $230 \text{ }^\circ\text{C}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ e mantida constante nesta temperatura até o final da análise (25 min).

A identificação dos compostos foi realizada pelos respectivos tempos de retenção, espectro de fragmentação de massas e por comparação com padrões autênticos.

5.5.3 Cromatografia de gel permeação (GPC - *Gel Permeation Chromatography*)

As análises de GPC foram realizadas com o intuito de observar a distribuição de massas dos polissacarídeos presentes nas frações **V-Sol-GD** e **P-Sol-GD**. Foi utilizado um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC - *High Pressure Size Exclusion Chromatography*) WATERS, equipado com detector de índice de refração diferencial (RID - *Refractive Index Detector*), modelo WATERS 2410, e espalhamento de luz em multiângulos (MALLS - *Multiangle Laser-Light Scattering*), WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram também utilizadas 4 colunas de gel permeação em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da. Como fase móvel para as análises foi utilizado o NaNO_2 $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ em NaN_3 $0,2 \text{ g.l}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ ml.min}^{-1}$.

As amostras foram solubilizadas em uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo 200 ppm de azida de sódio (NaN_3). A uma concentração final de 1 mg.ml^{-1} . Previamente à injeção das amostras, estas foram filtradas em membranas de acetato de celulose com porosidade de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$.

5.5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR – *Nuclear magnetic resonance*)

As frações solúveis obtidas após fracionamento por congelamento e degelo (**V-Sol-GD** e **P-Sol-GD**) foram analisadas por espectroscopia de

ressonância magnética nuclear. Os espectros de RMN de ^{13}C (1D) foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III, 400 MHz, com sonda inversa de 5 mm. As amostras foram solubilizadas em D_2O . Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN foram calibrados em relação ao sinal do 2,2,3,3-tetradeutério-3-trimetilsililpropionato (TMSP- d_4 – referência interna) em δ 0.

5.5.5 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC)

A cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC - *Ultra high performance liquid chromatography*) acoplada ao espectrômetro de massas foi utilizada para identificação dos metabólitos de baixa massa molecular dos extratos hidroalcoólicos (**V-Et70** e **P-Et70**) e das frações obtidas após fracionamento líquido-líquido (**Aq**, **BuOH**, **AcEt**, **CHCL₃**) de ambos os chás. A cromatografia foi realizada em um sistema Acquity-UPLC™ (Waters, MA, USA), composto por uma bomba binária, amostrador automático e forno de coluna. A detecção foi realizada por detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD – *Evaporative light scattering detector*), arranjo de fotodiodos (PDA - *photodiode array*, 200-400 nm) ou, nas análises *online*, por espectrometria de massas do tipo *electrospray* (ESI-MS – *electrospray ionization mass spectrometry*, m/z 100-1500).

As amostras foram mantidas em temperatura ambiente em sala climatizada (22 °C). As separações foram desenvolvidas em colunas próprias para UPLC™, BEH-C18™ com 50 mm x 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 μm de tamanho das partículas.

A separação ocorreu a 60 °C (temperatura da coluna) a um fluxo de 0,4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, usando 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e MeOH (solvente B), com um aumento linear do solvente B de 0 a 80% em 12 min, a 100% em 14 min, mantido até 15 min. Após retornar à condição inicial (0% B, em 16 min) o sistema foi reequilibrado por 2 minutos.

As amostras foram preparadas em MeOH- H_2O (1:1, v/v) a 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ e o volume de injeção foi de 10 μL .

5.5.6 Desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida bidimensional (2D-LC)

Para a primeira dimensão de análise utilizou-se o HPLC LC10A (Shimadzu) equipado com uma coluna de exclusão por tamanho (SEC - *size exclusion chromatography*, Ultrahydrogel-120 Waters), com 300 mm x 7,8 mm e 5×10^3 Da de limite de exclusão (Waters). A separação foi desenvolvida com um gradiente utilizando H₂O (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em um fluxo de 1 ml.min⁻¹ a 60 °C. O aumento linear do solvente B foi de 0 a 50 % em 40 min, mantido até 50 min e então retornado a condição inicial em 60 min. As amostras brutas (**V-Et70 e P-Et70**), cada uma com a concentração de 50 mg.ml⁻¹, foram preparadas em MeOH-H₂O (1:1 v/v) e o volume de injeção foi de 200 µL. Aliquotas de 1 ml foram coletas durante todo tempo de corrida, sendo então secas sobre fluxo de N₂ usando o evaporador Reacti-Vap (Thermo Scientific), e então transferidas à vias de UPLC com 0,2 ml de MeOH-H₂O (1:1, v/v).

A segunda dimensão foi realizada em um sistema de UHPLC com uma coluna de fase reversa BEH-C18TM como descrito no item 5.5.5. Os solventes foram os mesmos (ácido fórmico 0.1% (A) e MeOH (B)), mas as condições de separação foram diferentes. O fluxo foi de 1 ml.min⁻¹ e a temperatura da coluna foi de 80 °C. O gradiente de solvente foi obtido com aumento linear do solvente B como segue: início 0%, mantido por 0,2 min, então 40% em 4 min e 100% em 6 min mantido até 7 min, o retorno à condição inicial (0% B) foi em 7,5 min e a coluna recondicionada por mais 2 min. Os dados obtidos da detecção do PDA e ELSD na segunda dimensão foram exportados na forma de arquivos ASCII e processados pelo programa Sigma-Plot 12.

5.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.6.1 Avaliação da atividade dos polissacarídeos de *Camellia sinensis* em modelo de Sepsis murina

O modelo animal de indução da sepsis por perfuração do intestino simula a septicemia devido ao extravasamento de fezes e acesso das suas bactérias à corrente sanguínea (SPRONK *et al.*, 2004). Para a cirurgia de ligadura e

perfuração do ceco (CLP), os camundongos Swiss (7 a 8 semanas de idade) foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina (75/10 mg/kg, intraperitoneal), foi realizada uma incisão abdominal e, através desta abertura, a válvula ileocecal foi exposta da cavidade abdominal, o ceco foi parcialmente ligado e posteriormente perfurado (3 furos com agulha 22G). As perfurações foram confirmadas por uma leve pressão manual, a qual resultou em extravasamento de pequena quantidade de conteúdo intestinal. Após estes procedimentos, o intestino perfurado foi imediatamente recolocado na cavidade abdominal e a incisão foi suturada.

Após a cirurgia, todos os animais receberam uma injeção subcutânea de solução salina isotônica (1 ml/100 g) e foram acondicionados em caixas aquecidas até a recuperação total da anestesia.

Neste estudo, para efeitos de comparação da mortalidade, foram providenciados diferentes grupos, os quais estão listados abaixo:

- Grupo Falso-Operado - cujos animais foram anestesiados, sofreram a incisão e a sutura do abdômen, mas não foram submetidos à ligadura e perfurações do ceco;
- Grupo Controle – constituído por animais com indução de sepse e tratados somente com salina (soro fisiológico);
- Grupo de animais com indução de sepse tratados com o extratos **V-Sol-GD e P-Sol-GD** de *Camellia sinensis*. Ambos os extratos foram administrados uma vez ao dia, nas doses de 30, 50 e 100 mg/kg, referentes a cada grupo, por via subcutânea.

O tratamento foi mantido durante os sete dias seguintes à cirurgia. Neste período, a mortalidade dos animais foi quantificada a cada 12 horas. Posteriormente, as mortalidades dos diferentes grupos foram comparadas entre si. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (Autorização número 430).

5.6.1.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase é utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos nos tecidos. Nesta metodologia foram utilizados os pulmões de camundongos tratados ou não com os polissacarídeos dos chás verde e preto da *Camellia sinensis*. Os pulmões foram homogeneizados em tampão de HTAB (brometo de hexametilamônio) e centrifugados a 15000 rpm por 30 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados os reagentes TMB 1,6 M (tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogênio 1 mM em tampão fosfato. A atividade foi então mensurada espectrofotometricamente a 650 nm, a 37 °C, usando um leitor de microplacas.

5.6.1.2 Análise estatística

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão das médias. A avaliação dos resultados será realizada por meio do teste “t” de Student para amostras não pareadas ou por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, quando necessário. Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes.

5.6.2 Avaliação da atividade gastroprotetora

5.6.2.1 Animais

Ratos Wistar fêmeas (180-200 g) do biotério da UFPR foram mantidos sob condição padrão de laboratório (ciclo de 12 h dia/noite e temperatura de 22 ± 2 °C). Ração (Nuvital®, Curitiba/PR, Brasil) e água foram disponibilizadas à vontade. Os animais foram deixados em jejum por um período de 15-18 h antes do experimento.

5.6.2.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos

Ratos em jejum (n = 6 animais por grupo) foram tratados oralmente com veículo (H₂O, 0,1 ml/100 g de peso corpóreo), omeprazol (40 mg/kg), **V-Et70** (10, 30 e 100 mg/kg) e **P-Et70** (10, 30 e 100 mg/kg), 1 h antes da administração de etanol P.A. Após uma hora do tratamento com etanol os animais foram sacrificados por deslocamento cervical (ROBERT *et al.*, 1979). Os estômagos foram removidos, a mucosa gástrica foi exposta e, então, a lesão gástrica quantificada usando a seguinte fórmula: área lesionada (mm²) = comprimento da lesão (mm) x largura da lesão (mm) (ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2005).

5.6.2.3 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média ± erro médio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada usando análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados diferentes para um nível de significância de $p < 0,05$. A dose efetiva 50% (DE₅₀) foi calculada pela adaptação dos danos na equação: $V_i/V_o = 1/(1 + [I]/IC_{50})$, usando o KhaleidaGraph 3.0 para Windows (Synergy Software, PA, USA), onde V_i = atividade total, V_o = atividade residual.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. sinensis*

Os extratos **V-Brt** e **P-Brt** das folhas de chá verde e preto obtidos por meio da extração aquosa foram tratados com etanol, com a finalidade de separar compostos de alta massa molecular (polissacarídeos e proteínas) daqueles de baixa massa. A extração e o fracionamento dos polissacarídeos são resumidos na Figura 15 e os rendimentos apresentado na Tabela 1.

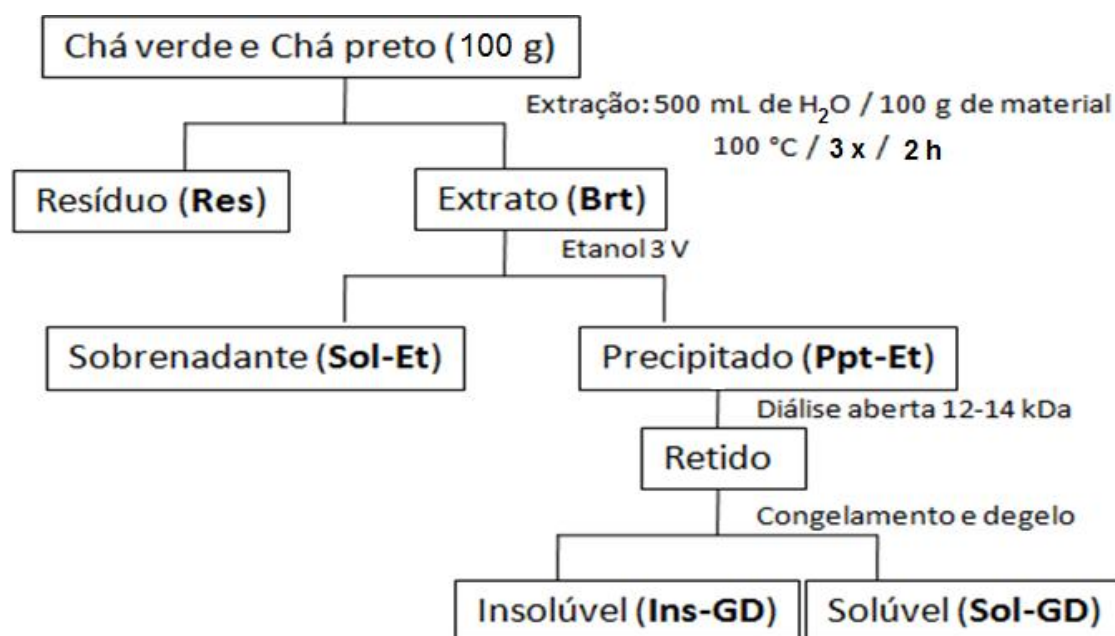


FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS PELA EXTRAÇÃO AQUOSA DO CHÁ VERDE E PRETO.

Após o fracionamento por congelamento e degelo, as frações solúveis (**Sol-GD**) e insolúveis em água fria (**Ins-GD**) foram obtidas. As frações insolúveis não foram analisadas no presente trabalho.

A Tabela 1 apresenta os rendimentos das frações obtidas, sendo que a quantidade de material utilizada na obtenção dos extratos aquosos foi de 100 g.

TABELA 1 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA PARA O CHÁ VERDE E O CHÁ PRETO A PARTIR DE 100 g DE MATERIAL.

Extrato	Chá Verde (g)	Chá Preto (g)
Brt	31,5	20,0
Sol-Et	25,1	14,5
Ppt-et	6,0	4,0
Sol-GD	4,7	2,8
Ins-GD	1,1	0,9

6.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS de *C. sinensis*

As frações **V-Sol-GD** e **P-Sol-GD** foram analisadas comparativamente quanto a composição monossacarídica, perfil cromatográfico em gel permeação e espectro de NMR. Além disso, foi avaliada a atividade antissepe destas frações. Com relação à composição monossacarídica, as amostras após a hidrólise foram analisadas por meio de TLC (Figura 16) e seus alditóis acetatos analisados por meio de GC-MS (Tabela 2). A TLC foi realizada no intuito de avaliar a presença de ácidos urônicos, que são característicos de estruturas pécticas, e que não são possíveis de analisar na forma de alditóis acetatos no GC-MS.

Na comparação com os padrões é possível observar a presença de ácido galacturônico como único açúcar ácido das amostras, além de arabinose, galactose e glucose como açúcares neutros, em ambas as amostras de chás.

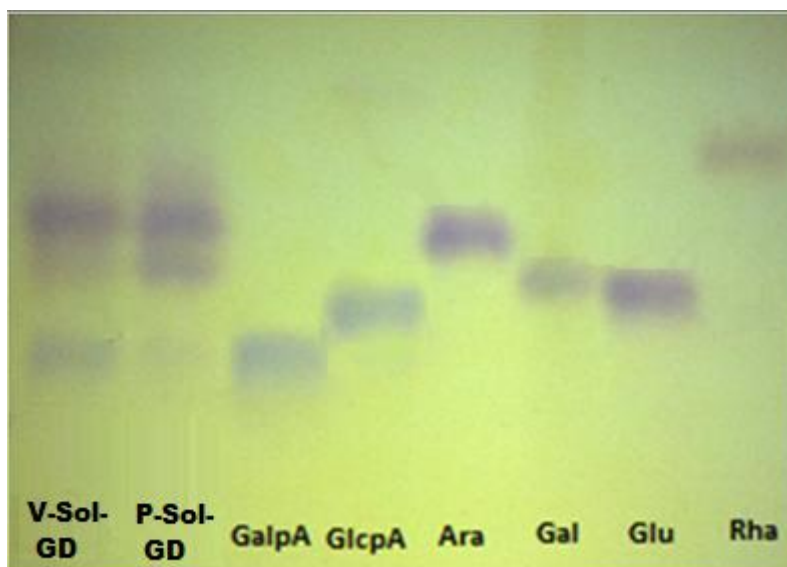


FIGURA 16 – TLC DAS FRAÇÕES V-SOL-GD E P-SOL-GD.

Os derivados acetatos de alditóis foram analisados por meio de GC-MS, observando-se que as amostras apresentaram como componentes monossacarídicos neutros principais arabinose, galactose, glucose. Observa-se também que as amostras provenientes de folhas de chá verde apresentaram maior proporção de ácido galacturônico quando comparadas ao chá preto e que nas folhas oxidadas ocorre um aumento na proporção de arabinose e glucose e uma diminuição na proporção de galactose (Tabela 2). A análise da composição monossacarídica sugere a presença de arabinogalactanas e polissacarídeos pécticos, ricos em ácido galacturônico, tais como, ácido poligalacturônico e ramnogalacturonana, como polissacarídeos majoritários dos chás verde e preto. No entanto, existem diferenças nas proporções de seus monossacarídeos, o que pode estar relacionado ao processamento das folhas durante a produção dos chás.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO FRACIONAMENTO POR CONGELAMENTO E DEGELO

Fração	Rha(%)	Ara(%)	Man(%)	Gal(%)	Glc(%)	GalA(%)*
V-Sol-GD	6	27	4	35	13	15
P-Sol-GD	8	53	4	18,3	12	5

* Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

As frações obtidas foram analisadas quanto a seu perfil de eluição em cromatografia de gel permeação, evidenciando a distribuição de massas moleculares dos polímeros presentes nas amostras. Nos cromatogramas pode-se observar que ambos os chás são compostos por misturas de polímeros, de acordo com o perfil polidisperso de eluição. Os cromatogramas estão ilustrados na Figura 17.

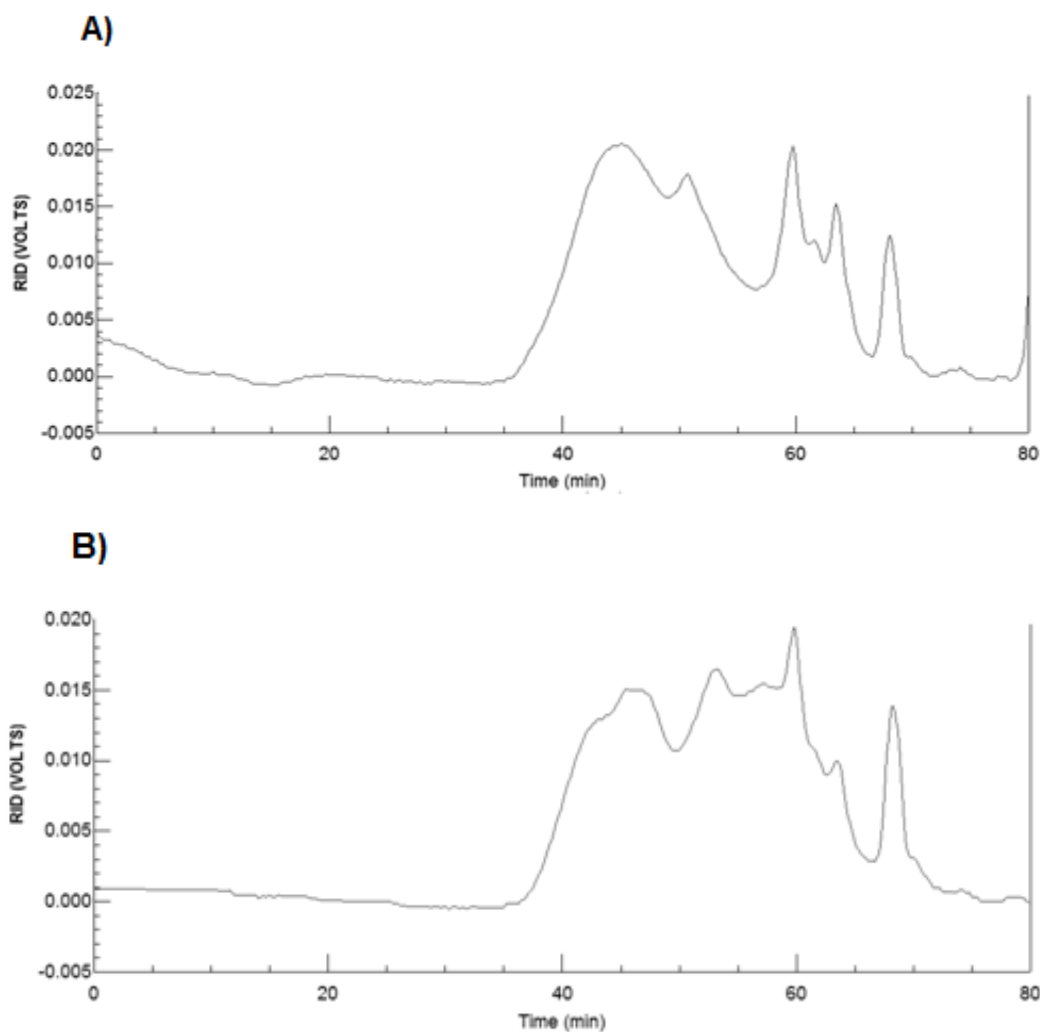


FIGURA 17 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE POR HPSEC-MALLS DAS FRACÇÕES **V-SOL-GD (A)** E **P-SOL-GD (B)**.

A análise comparativa entre as frações **V-Sol-GD** e **P-Sol-GD** também foi realizada por NMR de ^{13}C unidimensional (Figuras 18), no qual observa-se bastante similaridade entre as amostras.

O espectro de NMR de ^{13}C de **V-SoI-GD** (Figura 18A) apresentou sinal de carboxila esterificada de unidades de ácido galacturônico (δ 171,3), confirmado pelo sinal em δ 53,4, típico dos ésteres metílicos presentes em C-6 das unidades de galacturonatos (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003). O sinal em δ 100,7 é do C-1 em ligação 1 \rightarrow 4 de unidades de α -GalpA (WANG *et al.*, 2009). O espectro mostra também sinal em δ 79,2, confirmando a ligação 1 \rightarrow 4 do ácido galacturônico, e sinais em δ 71,3 e δ 61,8 correspondente a C-5 e C-2 das unidades de GalpA.

Na região dos carbonos anoméricos ainda pode-se observar sinal em δ 103,9 indicando C-1 de unidade de β -Galp, além disso, foram observados sinais característicos dos carbonos substituídos em δ 68,8 e δ 82,2 característicos de C-6 e C-3 ligados das unidades de β -D-Galp, respectivamente (CIPRIANI *et al.*, 2004, DELGOBO *et al.*, 1999). Sinais em δ 77,4 e δ 73,9, foram atribuídos ao C-5 e C-2 não substituídos, respectivamente das unidades de β -D-Galp (GORIN; MAZUREK, 1975; SIMAS, 2008), e aquele em δ 61,4 ao C-6 livre das unidades de β -D-Galp (AGRAWAL, 1992).

Em contraste com a análise da composição monossacarídica, o espectro de RMN não apresentou sinal, em δ ~108, referente ao C-1 de unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1998; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002). Contudo, pode-se sugerir que esta fração contém uma estrutura péctica constituída de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4) ligado na cadeia principal e a presença de galactose 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6-ligadas.

Os ácidos poligalacturônicos (PGAs) são estruturas pécticas, sendo homopolímeros formados por unidades de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4)-ligadas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Já as arabinogalactanas tipo II são formadas por um amplo grupo de cadeias curtas de (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) β -D-galactanas conectadas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6 e apresentam a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

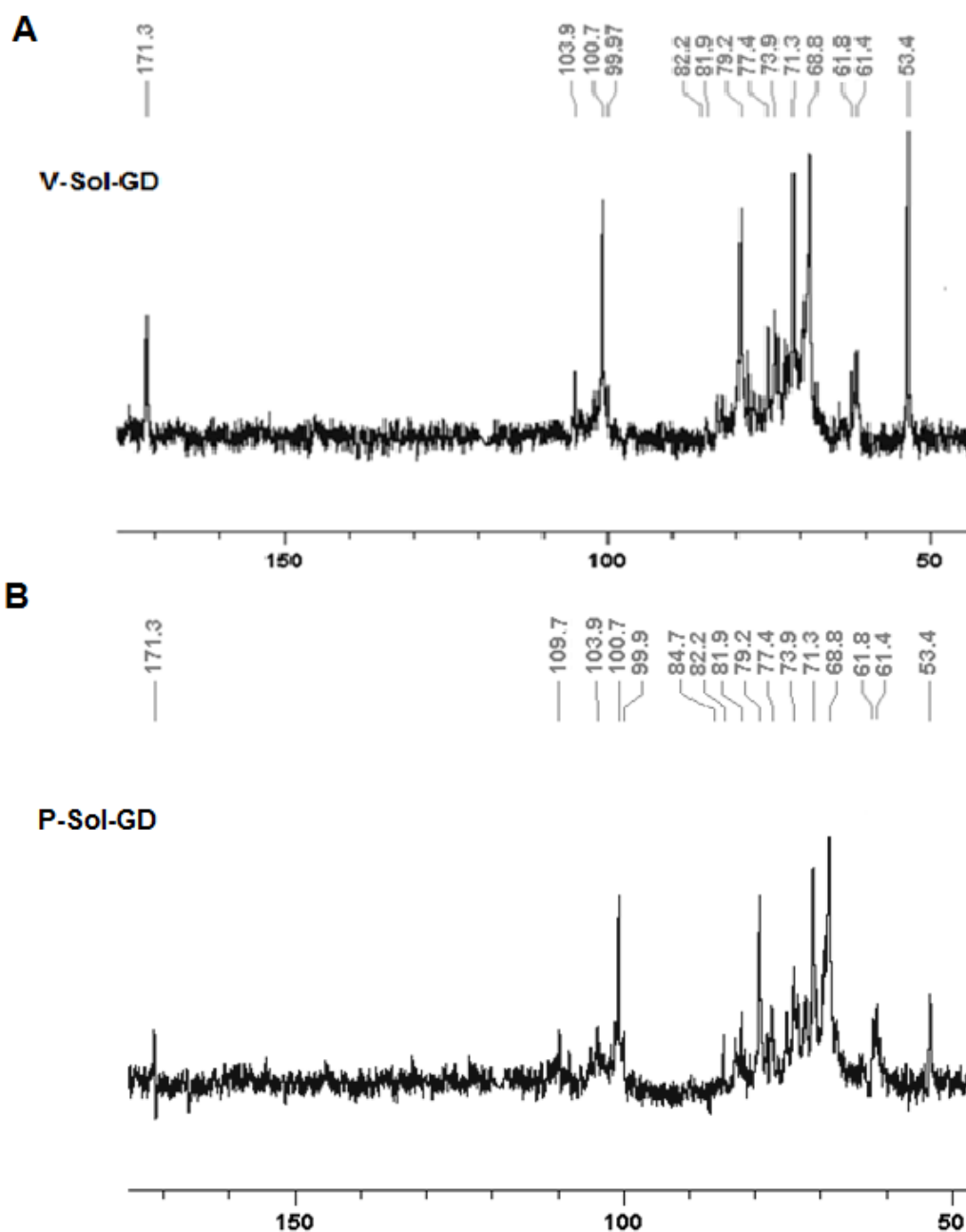


FIGURA 18 - ESPECTRO UNIDIMENSIONAL DE ^{13}C DAS FRAÇÕES V-SOL-GD (A) E P-SOL-GD (B) EM D_2O A 70°C .

Em relação ao chá preto, o espectro de NMR de ^{13}C da fração **P-Sol-GD** (Figura 18B) apresentou sinal típico de carboxilas de unidades de ácido galacturônico em δ 171,3, o qual foi menos intenso se comparados com o chá verde, o que é condizente com os dados da dosagem de ácido urônico. O sinal em δ 100,7 corresponde ao C-1 de unidades de α -GalpA em ligação 1 \rightarrow 4 (RENARD *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1998). O sinal com δ 79,2 na região dos

carbonos substituídos, confirma o ácido galacturônico ligado em 1→4, o sinal em δ 53,4 é de grupamentos CH_3 ligados em C-6 das unidades do ácido galacturônico (MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003) e o sinal em δ 71,3 correspondente a C-5 de unidades de GalpA. Observa-se também sinal em δ 103,9 de C-1 de β -D-Galp (TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002; FRANSEN *et al.*, 2000). E sinais em δ 68,8 e δ 82,2 característicos de C-6 e C-3 ligados das unidades de β -D-Galp, respectivamente (CIPRIANI *et al.*, 2004, DELGOBO *et al.*, 1999) Sinais em δ 77,4 e δ 73,9 foram atribuídos ao C-5 e C-2 não substituídos, respectivamente das unidades de β -D-Galp (GORIN; MAZUREK, 1975; SIMAS, 2008). O sinal em δ 109,7 foi atribuído ao C-1 de unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1998; TISCHER; GORIN; IACOMINI, 2002; FRANSEN *et al.*, 2000), e aquele em δ 84,7 ao C-3 de α -L-Araf. Um sinal δ 61,4 de C-5 de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1999) e outro em δ 61,8 do C-6 livre das unidades de β -D-Galp também foram observados (AGRAWAL, 1992).

A partir dos dados obtidos é possível sugerir que o extrato aquoso do chá preto contém como principais polissacarídeos um ácido poligalacturônico e uma arabinogalactana tipo II.

Com a análise destes dados, pôde-se observar que existe diferença entre os dois tipos de chás analisados, principalmente com relação à degradação de alguns compostos, como o ácido carboxílico no chá preto, sugerindo que o processo oxidativo possa estar interferindo na estrutura química desses polissacarídeos, o que também pode ser observado na dosagem de ácidos urônicos. Embora o chá verde possua um maior conteúdo de ácido galacturônico do que o chá preto, ambos apresentam os sinais referentes a esta unidade monossacarídica bastante intensos no espectro de NMR, quando comparados aos demais monossacarídeos. Isso pode estar relacionado à solubilidade das amostras durante análise de NMR, onde observou-se leve precipitação do conteúdo com o decorrer do tempo.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DO CHÁ VERDE E PRETO NA SEPSE

As frações **V-Sol-GD** e **P-Sol-GD** foram analisadas com relação à atividade protetora na sepse conforme descrito anteriormente (item 5.6.1). Os animais cuja válvula ileocecal foi perfurada desenvolveram a sepse e apresentaram uma mortalidade acentuada. A mortalidade destes animais tratados com salina (controle) teve início 24 horas após a indução da sepse, com mortalidade atingindo 36,4% e 63,6% nos tempos de 24 e 48 horas após a ligadura e perfuração do ceco (CLP). A mortalidade total do grupo controle ao final do período de observação foi de 100% dos animais (Figura 18). A letalidade foi significativamente reduzida pelo tratamento com o chá verde nas doses de 30, 50 e 100 mg/kg.

Ao final da observação, a sobrevivência destes grupos correspondeu a 25% para a dose de 30 mg/kg e de 40% para ambas doses de 50 e 100 mg/kg, mostrando que o aumento da dose para 100 mg/kg não alterou o índice de sobrevivência (Figura 19 A).

Resultados semelhantes, porém com menor proteção contra a letalidade, foram observados nos grupos tratados com o chá preto (Figura 19 B). Nas doses de 30, 50 e 100 mg/kg a taxa de sobrevivência foi igual, respectivamente, a 20%, 25% e 20%.

Nenhuma morte foi observada nos animais do grupo falso-operado. Este resultado comprova que a simples abertura da cavidade abdominal (grupo falso operado) seguida da exposição da válvula ileocecal dos animais, não causa a sepse.

Sabe-se que polissacarídeos de diversas fontes e com uma grande variedade de estruturas químicas apresentam atividades biológicas, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, imunomodulatória, etc. (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; PAULSEN, 2001) e que alguns polissacarídeos também apresentam efeitos benéficos confirmados na sepse (KIM *et al.*, 2003; RUTHES *et al.*, 2011).

Assim, os resultados deste experimento demonstraram uma atividade significativa dos polissacarídeos dos chás verde e preto sobre a sepse. Tratando-

se de polissacarídeos, este é um resultado positivo, uma vez que geralmente as atividades benéficas da planta são atribuídas aos polifenóis. Neste experimento mostrou-se, portanto, que os polissacarídeos da *C. sinensis* também podem proteger da letalidade por sepse, possivelmente devido ao potencial anti-inflamatório.

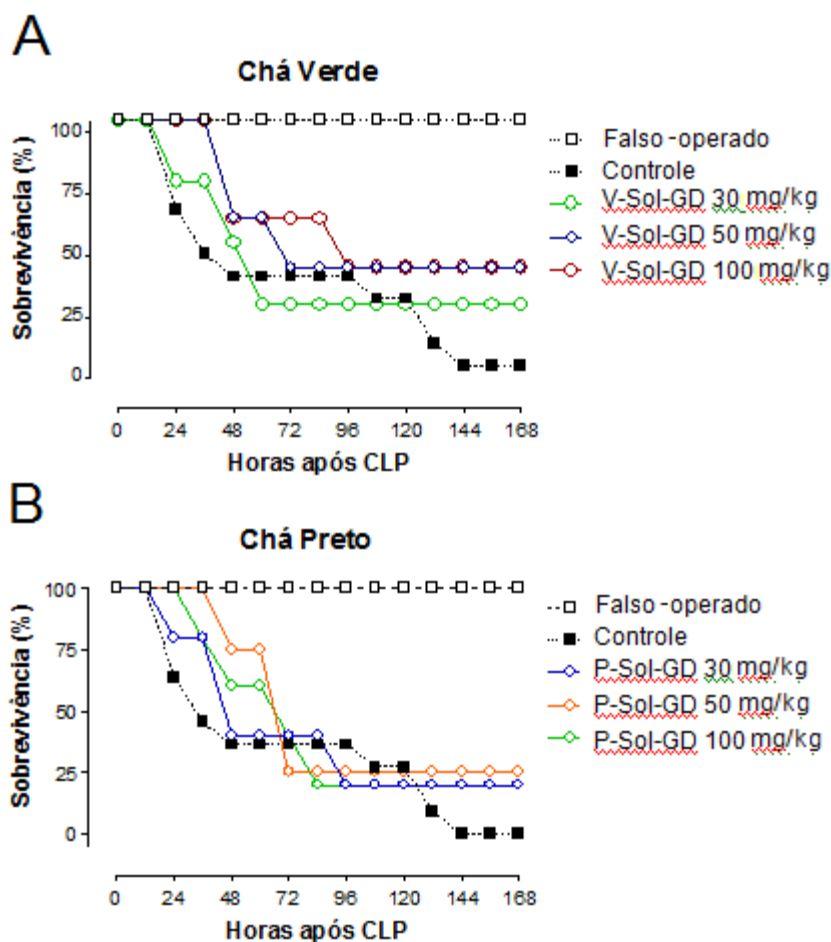


FIGURA 19 - CURVA DE LETALIDADE NA SEPSE EM ANIMAIS TRATADOS OU NÃO COM OS POLISSACARÍDEOS DO CHÁ VERDE (A) E PRETO (B).

6.3.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos pulmões dos animais tratados ou não com os polissacarídeos do chá verde e preto

A atividade da mieloperoxidase (indicativa de acúmulo tecidual de neutrófilos) foi quantificada espectrofotometricamente em homogenato de pulmões coletados 18 horas após indução da CLP. Os camundongos submetidos à sepse foram tratados com salina (controle), **V-Sol-GD** ou **P-Sol-GD** (30 e 50 mg/kg) ou dexametasona (0.5 mg/kg) imediatamente após a cirurgia.

A sepse elevou consideravelmente a atividade da MPO (50,2%) em relação ao grupo falso operado. Este aumento foi prevenido significativamente pelos polissacarídeos dos chás verde e preto (**V-Sol-GD** e **P-Sol-GD**) na dose de 50 mg/kg, com inibições correspondentes a 33,3% e 28,4%, respectivamente (Figura 20). A dexametasona, usada como controle anti-inflamatório, inibiu a infiltração de neutrófilos (45,2%), avaliada indiretamente pela atividade da MPO.

Os animais tratados com as doses de 30 mg/kg não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle quanto à atividade desta enzima.

Isso confirma o efeito positivo dos polissacarídeos na inflamação tendo em vista a diminuição da migração de neutrófilos ao sítio inflamatório (avaliada indiretamente pela atividade da MPO). A migração aumentada de neutrófilos na sepse tem sido relacionada a diversos efeitos deletérios que levam à lesão tecidual e à falência dos órgãos e, conseqüentemente, à morte (LANDRY; OLIVER, 2001). A redução desta migração é considerada um dos fatores que podem prevenir a mortalidade por sepse e pode estar relacionada, ao menos em parte, à maior sobrevivência dos animais com sepse observada anteriormente.

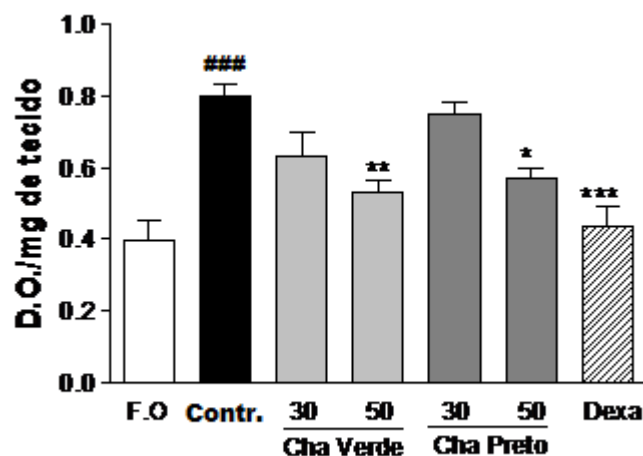


FIGURA 20 - ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MODIFICAÇÕES NA DENSIDADE ÓPTICA POR MILIGRAMA DE PROTEÍNA. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ### $P < 0.001$ EM RELAÇÃO AO GRUPO FALSO OPERADO (F.O.), *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ E * $P < 0.05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE.

6.4 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

Os extratos provenientes da extração hidroalcoólica denominados **V-Et70** e **P-Et70** contém os compostos extraídos com etanol 70%. Estes foram também submetidos ao particionamento líquido-líquido, gerando as frações correspondentes **Aq**, **BuOH**, **AcEt** e **CHCl₃**, para ambos os chás analisados. A determinação dos compostos presentes nos extratos e/ou frações foi feita pelas técnicas de UHPLC, ESI-MS, e pela técnica 2D-LC desenvolvida neste trabalho. Além disso, os extratos brutos (**V-Et70** e **P-Et70**) foram analisados quanto sua atividade gastroprotetora. Os rendimentos destes extratos e suas frações são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - RENDIMENTOS DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS E DAS FRAÇÕES RESULTANTES DO PARTICIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO OBTIDOS NO CHÁ VERDE E PRETO.

Extrato	Chá Verde (g)	Chá Preto (g)
Et70 ^a	20,9	21,15
Aq ^b	0,06	0,05
BuOH ^b	0,15	0,16
AcEt ^b	0,09	0,10
CHCl ₃ ^b	0,17	0,16

^aRendimento em relação a 100 g do material de partida.

^bRendimento após fracionamento líquido-líquido em relação a 500 mg de Et70

6.4.1 Identificação de compostos por UHPLC-PDA-ESI-MS

A *C. sinensis* pode ser considerada um bom modelo para o desenvolvimento de métodos analíticos na análise de misturas fitoquímicas. Extratos altamente complexos foram obtidos da extração hidroalcoólica (etanol 70%) tanto para o chá verde, quanto para o chá preto. Como esperado, ocorreu uma grande variação na polaridade dos compostos, variando desde os carboidratos até os lipídeos (Tabela 4, página 79). O tempo total de análise em

UHPLC foi menor que 16 minutos (Figura 21 A e B), mas pode ser observado que um grande número de compostos coeluíram, como por exemplo os picos **27, 28, 29 e 30** (Figura 21 A)

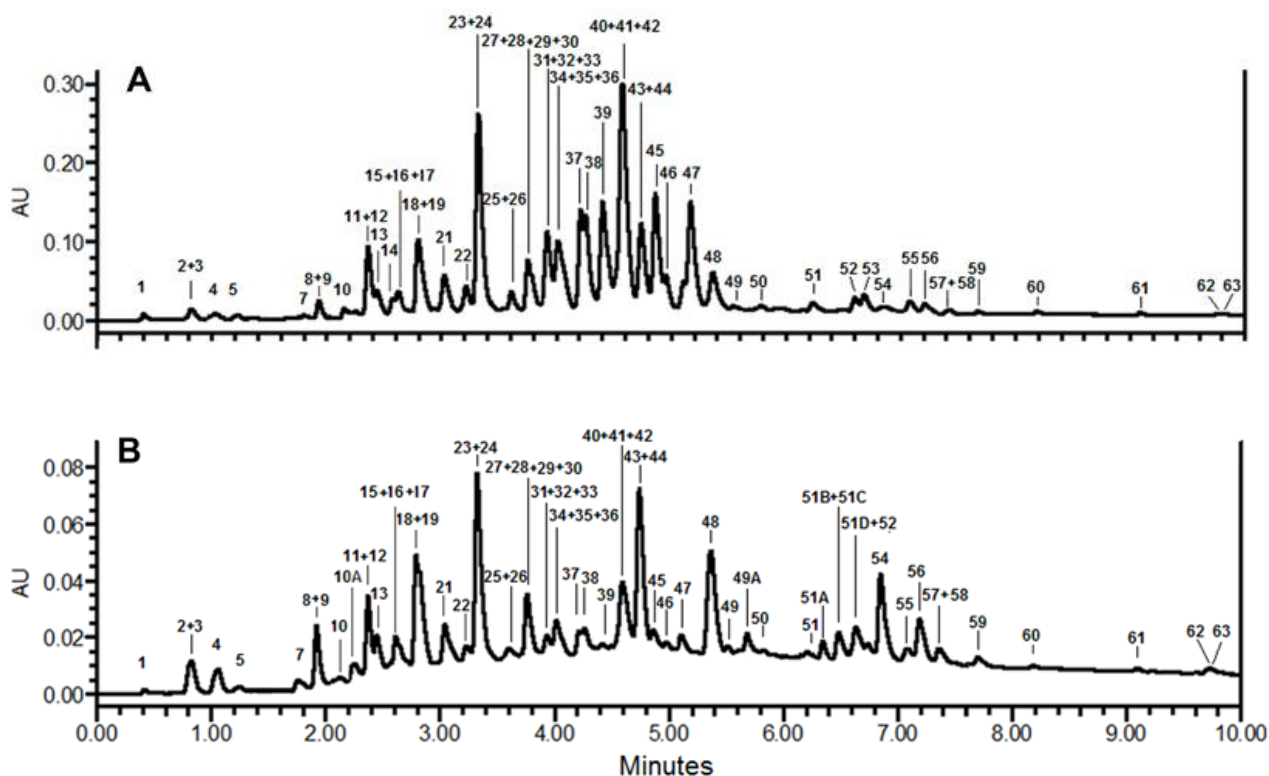


FIGURA 21 - CROMATOGRAMA UHPLC-PDA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS **V-ET70** (A) E **P-ET70** (B).

6.4.2 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico do chá verde

Após o particionamento líquido-líquido do extrato **V-Et-70**, a menor complexidade das frações permitiu uma melhor identificação dos constituintes. A identificação dos picos foi baseada em seu tempo de retenção (Rt), espectro de UV e padrões de fragmentação de massa por comparação com dados da literatura (DEL RIO *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008; ENGELHARDT, 2010). Os compostos presentes em ambos os chás estão identificados na Tabela 4 (página 79).

6.4.2.1 Fração aquosa (V-Aq)

A fração aquosa (**V-Aq**), obtida do particionamento líquido-líquido do extrato bruto (**V-Et70**), reteve principalmente o ácido 3- e 5-*p*-coumaroilquínico (picos **13** e **23**), ácidos 3- e 5-galoilquínico (picos **2** e **4**), e ácidos 3-,4- e 5-cafeoilquínico (picos **7**, **8** e **19**), os quais puderam ser identificados de acordo com suas massas e dados da literatura (LIN *et al.*, 2008, ZHAO *et al.*, 2011). Além disso, alguns flavonóis mono-di- e tri-glicosídeos também puderam ser observados (picos **33**, **34**, **38**, **39**, **40**, **41**, **45**, **47**, **48** e **49**) (Figura 22, Tabela 4)

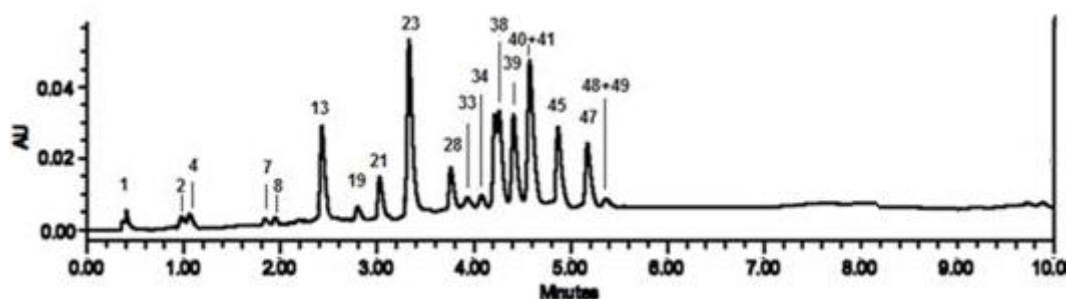


FIGURA 22- CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO AQUOSA DO CHÁ VERDE (V-Aq).

6.4.2.2 Fração butanólica (V-BuOH)

A fração butanólica (**V-BuOH**) contém a maioria dos flavonóides glicosídeos. Em *C. sinensis* estes são muito diversificados, contendo caempferol, quercetina, miricetina, e apigenina como agliconas, sendo glicosilados por arabinose, ramnose, galactose e glucose ou por oligossacarídeos, os quais ainda podem conter ésteres de acetatos ou ácidos cinâmicos (LIN *et al.*, 2008, ENGELHARDT *et al.*, 2010). Estes compostos foram observados a λ 325 nm e confirmados por *tandem-MS* (SOUZA *et al.*, 2008a, LIN *et al.*, 2008, ZHAO *et al.*, 2011).

Os flavonóides glicosídeos tiveram um tempo de eluição relativamente rápido (3,5-8,5 min). Estes foram identificados como flavonóis monoglicosídeos (picos **28**, **30**, **33**, **34**, **40**, **42**, **48**, **49**, **50**, **51** e **52**), diglicosídeos (picos **36**, **44** e **62**), triglicosídeos (picos **29**, **32**, **39**, **41**, **45**, **47**, **54**, **57**, **59** e **63**) e tetraglicosídeos (picos **53**, **55**, **56** e **60**), além de algumas flavonas diglicosídeos

(picos **35** e **37**) (Figura 22). Já para os flavonóides acilados pelo ácido *p*-coumárico, como a porção *p*-coumaroil é um sítio não polar no glicosídeo, os tempos de retenções (Rt) foram maiores do que os não acilados, com Rt próximo de 7 minutos (picos **49**, **52-57**, **59-63**). Além desses compostos, foram encontrados taninos condensados (principalmente dímeros) (picos **12** e **17**), os quais foram identificados com base em seu perfil de fragmentação e por comparação com dados previamente reportados (SOUZA *et al.*, 2008b) (Tabela 4, página 79).

As saponinas, outra classe de glicosídeos, estão presentes na fração **V-BuOH**, entretanto sua detecção foi muito baixa no PDA, por isso ela foi feita pelo ELSD, e devido à natureza acídica das saponinas, elas tiveram boa detecção no ESI-MS (Figura 23 B). As saponinas foram a última classe de compostos na fração butanólica que eluíram na coulona BEH-C18, com Rt entre 10-12min (picos **66-85**, Tabela 4 (página 79). Há poucos estudos acerca das estruturas das saponinas presentes em *C. sinensis*. São encontradas aproximadamente 10 estruturas para o chá verde, incluindo isômeros contendo grupos angeloil ou tigloil, ou então grupos (*E*)-ou (*Z*)-cinamoil (MATSUY *et al.*, 2009). Esta grande variação pode causar sobreposição de picos o que dificulta a análise. Contudo, 20 saponinas diferentes foram encontradas neste trabalho (Figura 23 B). Elas têm similaridade com as saponinas previamente descritas, parecendo ser novos isômeros, nos quais as posições dos grupos acil são diferentes.

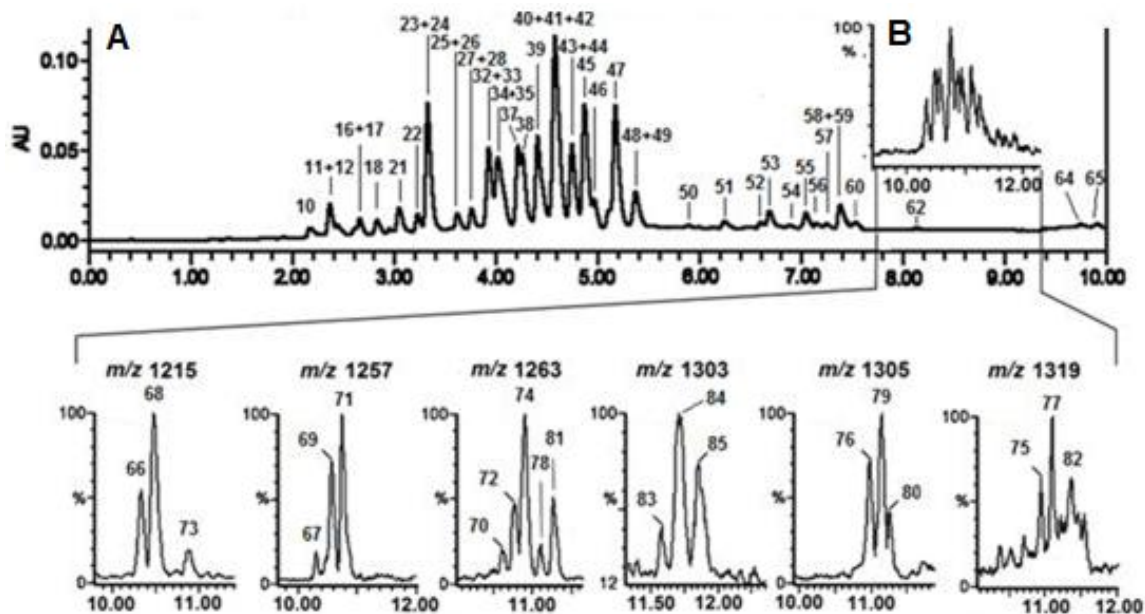


FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DO CHÁ VERDE (V-BuOH), A) DETECTOR PDA E B) INSERTO DAS SAPONINAS DETECTADAS PELO ELS.

Quatro flavonóis glicosídeos foram retidos na fração butanólica, os quais foram relatados pela primeira vez. Eles são compostos por miricetina, quercetina e caempferol ligados a uma hexose (galactose ou glucose) com um éster de ácido gálico (Figura 24).

Glicosídeos similares foram encontrados em outras plantas, como a quercetina 3-O-glucosil-6''-O-galato em *Tellima grandiflora* e *Polygonum hydropiper* (COLLINS *et al.*, 1975; PENG *et al.*, 2003). Sendo assim, os espectros MS² produziram: m/z 631 (M-H)⁻, com fragmentos de m/z 479 (M – galoil), 317 (miricetina) 169 (galato), correspondente ao pico **25** (Figura 24 A); m/z 615 (M-H)⁻, com fragmentos de m/z 463 (M–galoil), 301 (quercetina) e 169 (galato), correspondente ao pico **38** (Figura 24, B); m/z 599 (M-H)⁻, com fragmentos de m/z 447 (M–galoil), 285 (caempferol) e 169 (galato), correspondente aos picos **43** e **46** (Figura 24 C). A diferença estrutural entre os picos **43** e **46** podem ser devido ao tipo de monossacarídeos ligados (ex.: glucose ou galactose) ou nas posições dessas ligações.

A partir dos resultados obtidos por espectrometria de massas, foram propostas estruturas para estes compostos (Figura 24), as quais são baseadas nas estruturas já relatadas para outras plantas (COLLINS *et al.*, 1975; PENG *et*

al., 2003), Porém, apenas com as fragmentações obtidas, não se pode afirmar qual a posição exata das ligações do grupo galoil nos açúcares, ou mesmo a ligação dos açúcares nas agliconas.

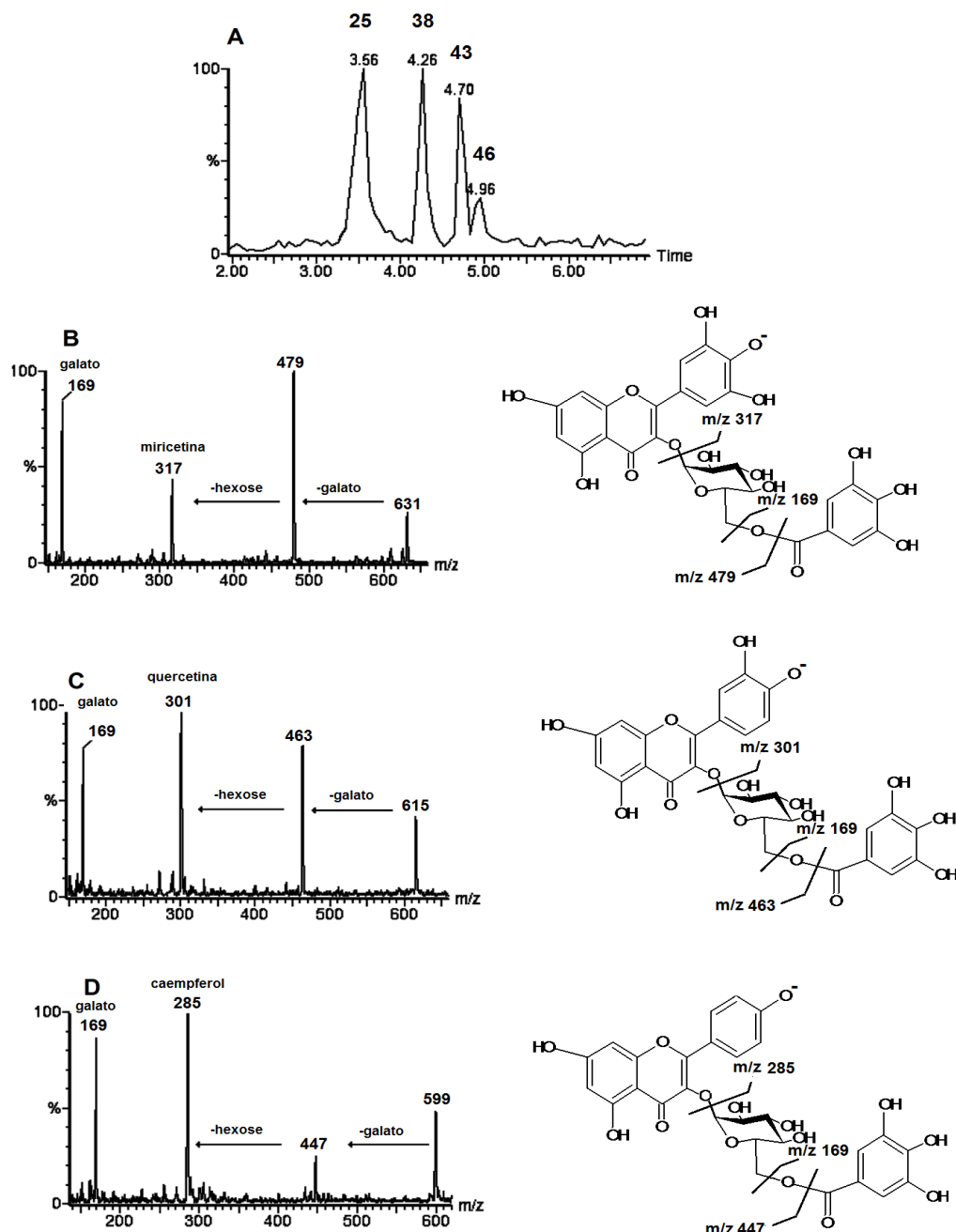


FIGURA 24 – (A) CROMATOGRAMA DOS NOVOS FLAVONÓIS GLICOSILADOS ENCONTRADOS EM *C. sinensis* E ESPECTROS DE MASSAS DESTES COMPOSTOS, COM SUAS DEVIDAS ESTRUTURAS PROPOSTAS (B) MIRICETINA GALOIL HEXOSÍDEO, (C) QUERCETINA GALOIL HEXOSÍDEO E (D) CAEMPFEROL GALOIL HEXOSÍDEO.

6.4.2.3 Fração acetato de etila (**V-AcEt**)

Os flavan-3-ols (catequinas) são os principais flavonóides encontrados no chá verde e são geralmente encontradas como derivados ésteres de galatos. Estes compostos foram concentrados na fração acetato de etila (**V-AcEt**). As principais catequinas encontradas foram a epigalocatequina galato (Rt 2,80 min, m/z 457 $[M-H]^-$, pico **18**) e epicatequina galato (Rt 3,75 min, m/z 441 $[M-H]^-$, pico **27**) (Figura 25). Outros compostos como a galocatequina, epigalocatequina, catequina, epicatequina e galocatequina galato (picos **5**, **10**, **21** e **22**) também foram encontrados, mas em menores quantidades, o que é consistente com dados da literatura (DEL RIO *et al.*, 2004; NEILSON *et al.*, 2006; SPÁCIL *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011). Além disso os picos **52**, **53**, **54**, **55**, **56**, **58**, **59** e **60** correspondem aos flavonóides glicosídeos contendo ésteres de ácido *p*-coumárico, os quais conferem um sítio apolar de ligação aos compostos.

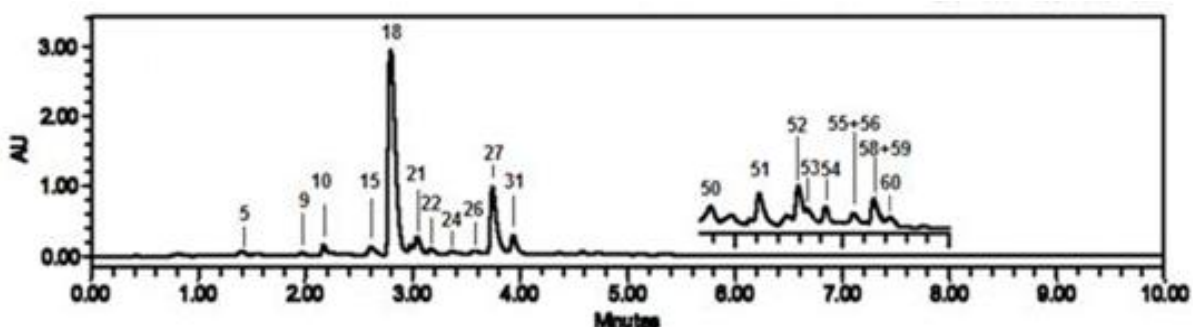


FIGURA 25 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CHÁ VERDE (**V-AcEt**).

6.4.2.4 Fração Clorofórmica (**V-CHCl₃**)

A fração clorofórmica do chá verde (**V-CHCl₃**) apresentou apenas dois picos com Rt de 1,78 (pico **6**) e 2,95 min (pico **20**), os quais foram identificados como sendo a teobromina e a cafeína, respectivamente (Figura 25), as quais são os alcalóides de purina mais comumente encontrados em *C. sinensis* (DEL RIO *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2011).

Nenhum lipídeo pode ser encontrado por esta análise, assim esta fração foi analisada por ESI-MS em modo positivo e negativo, revelando uma série de

fosfolípidos e glicolípidos (picos **86-112**) (Figura 26 A e B). Utilizando-se a detecção de íons positivos, os principais lípidos encontrados foram fosfatidilcolina (PC, picos **88, 97, 101 e 102**), os glicolípidos monogalactosildiacilglicerol (MGDG, picos **87, 89, 98 e 99**) e digalactosildiacilglicerol (DGDG, picos **93 e 100**), os quais apareceram como adutos de Li^+ (Tabela 4, página 81). Na detecção de íons negativos, um glicolípeido principal foi observado, com m/z 815, o qual foi posteriormente confirmado por *tandem-MS*, sendo ele um sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG, pico **103**) esterificado pelos ácidos palmítico e linolênico. Outros lípidos SQDG foram identificados contendo outras combinações de ácidos graxos (picos **96, 104-107**) (SOUZA *et al.*, 2007). Fosfatidilglicerol (PG, pico **95**), SQDG e fosfatidilinositol (PI, picos **92 e 94**) foram os principais fosfolípidos encontrados em modo negativo. Todos os lípidos detectados contêm muitas combinações de ácidos graxos, principalmente os ácidos palmíticos (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) (SOUZA *et al.*, 2007).

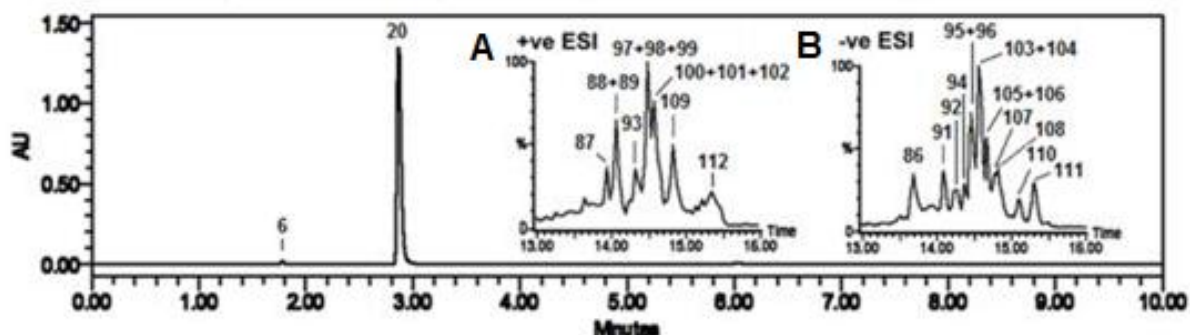


FIGURA 26 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DO CHÁ VERDE (V-CHCl_3). (A) ESI-MS EM MODO POSITIVO E (B) ESI-MS EM MODO NEGATIVO

6.4.3 Análise das frações obtidas por particionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico do chá preto

6.4.3.1 Fração Aquosa (**P-Aq**)

Assim como observado para o extrato de chá verde, o fracionamento por partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico do chá preto possibilitou uma boa separação dos compostos baseada em suas polaridades. Na fração aquosa (**P-Aq**), os principais compostos identificados foram ácido quínico (pico **1**) e seus ésteres, como o ácido 3- e 5-galoilquínico (picos **2** e **4**, respectivamente), ácido 3- e 5-*p*-coumaroilquínico (picos **13** e **23**) e ácido 3-, 4- e 5- cafeoilquínico (picos **7**, **8** e **19**) (Figura 27). Alguns picos de flavonóis glicosídeos também puderam ser identificados, porém bem menos intensos do que os observados para a mesma fração do chá verde (V-Aq) (picos **37**, **38**, **40**, **41**, **43**, **44**, **45**, **46**, **48** e **49**)

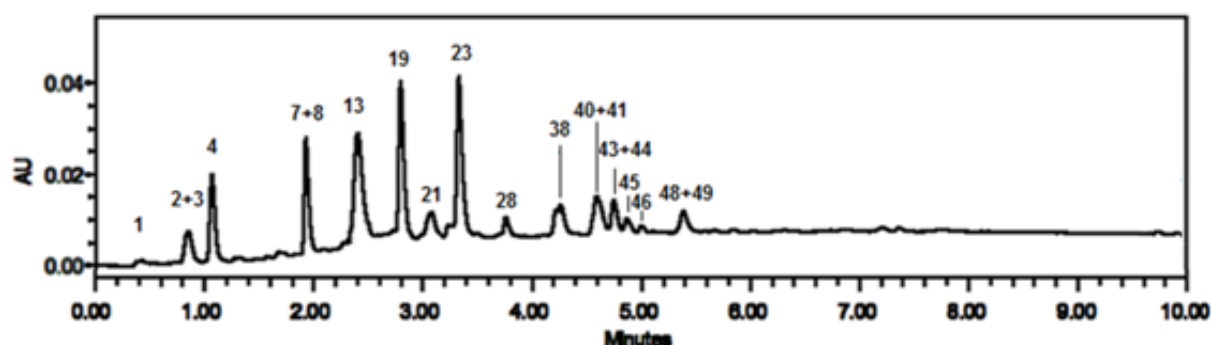


FIGURA 27 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO AQUOSA DO CHÁ PRETO (**P-Aq**).

6.4.3.2 Fração butanólica (**P-BuOH**)

Os flavonóides glicosídeos concentrados na fração butanólica (**P-BuOH**) estão presentes em uma menor concentração quando comparados com os encontrados no chá verde, sendo os picos **39**, **41**, **45** e **47**. Contudo, flavonóides glicosídeos contendo ésteres de ácido *p*-coumárico foram mais evidentes no chá preto do que no chá verde (picos **54**, **57**, **59** e **61**) (Figura 28). Esses flavonóides glicosídeos são principalmente compostos de quercetina ou caempferol ligados a diferentes monossacarídeos, e também ao grupo *p*-coumaroil. Estes foram

identificados como quercetina-3-*O-p*-coumaroil-diramnosilhexosídeo (picos **54** e **59**), caempferol-3-*O-p*-coumaroil-diramnosilhexosídeo (picos **57** e **61**), caempferol-3-*O-p*-coumaroil-glucosilramnosídeo (pico **62**) e caempferol-3-*O*-acetil-diramnosilhexosídeo (pico **63**), os quais já foram anteriormente relatados (LIN *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2011). Além disso, em contraste com a mesma fração do chá verde, não foram observadas as saponinas.

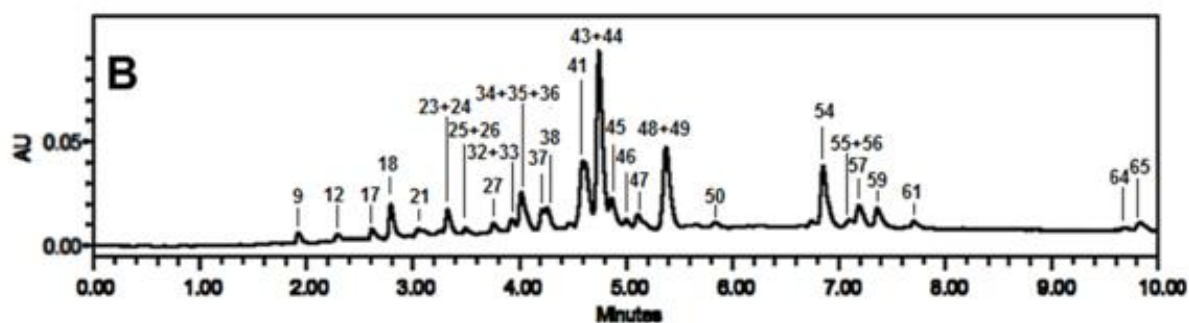


FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DO CHÁ PRETO (P-BuOH).

6.4.3.3 Fração acetato de etila (P-AcEt)

Na fração acetato de etila (P-AcEt) obtida do chá preto, foi observada uma redução considerável no conteúdo de catequinas. Isto é resultado da ativação enzimática, a qual gera produtos de condensação das catequinas, como teaflavinas e tearubiginas (FINGER *et al.*, 1992; BALENTINE *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2000). As seguintes teaflavinas foram concentradas na fração acetato de etila, encontrados no RP-UHPLC entre 6-7 minutos (Figura 29): teasinensis A, epiteaflagalina-3-galato, teaflavina, teaflavina-3-galato, teaflavina-3'-galato e teaflavina-3-3'-digalato (picos **10A**, **49A**, **51A**, **51B**, **51C** e **51D**, respectivamente). Embora sejam relatadas como constituintes do chá preto, as tearubiginas não foram identificadas neste trabalho.

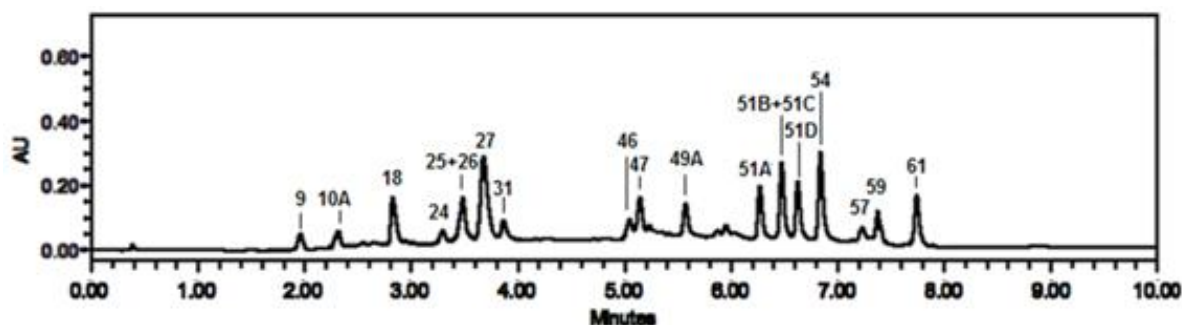


FIGURA 29 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CHÁ PRETO (P-AcEt).

6.4.3.4 Fração clorofórmica (P-CHCl₃)

Na fração clorofórmica, assim como para o chá verde, foram identificados a cafeína e a teobromina, que apareceram em 1,78 e 2,95 minutos (picos **6** e **20**) no UHPLC-PDA (Figura 30). As análises por ELSD e MS revelaram conteúdos de lipídeo menores do que os encontrados na fração clorofórmica do chá verde (Figura 30).

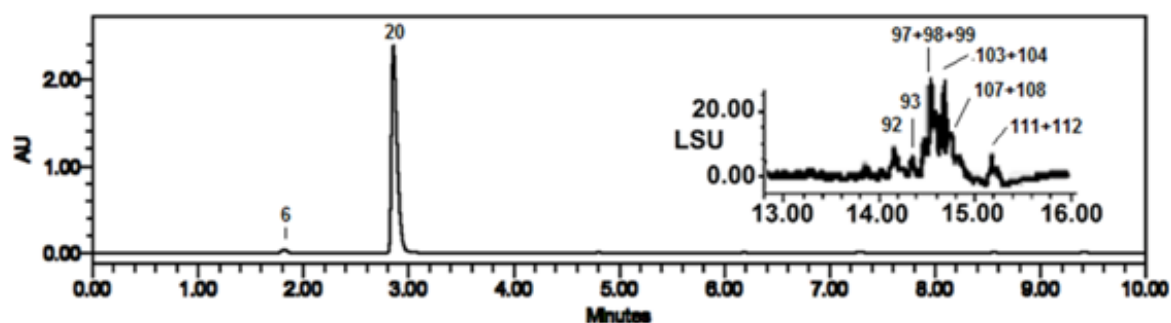


FIGURA 30 - CROMATOGRAMA DE UHPLC-PDA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA DO CHÁ PRETO (P-CHCl₃), COM INSERTO DA REGIÃO DETECTADA POR ELSD.

A Tabela 4 traz todos os compostos identificados no chá verde e no chá preto, por meio das análises de UHPLC-ESI-MS, os quais foram melhor observados nas técnicas de análise após a realização do fracionamento líquido-líquido.

TABELA 4 - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DO CHÁ VERDE E PRETO NA ANÁLISE UNIDIMENSIONAL POR UHPLC-ESI-MS

Picos	[M-H] (m/z)	MS/MS (m/z)	UV- λ .max (nm)	Composto	Verde	Preto
1	191	-	215, 275	Ácido quínico	+	+
2	343	191, 173, 169	273	Ácido 3-galoilquínico	+	+
3	331	169	273	Galoil glucose	+	+
4	343	191, 173, 169	273	Ácido 5-galoilquínico	+	+
5	305	-	210, 270	(+)-Galocatequina	+	+
6 ^a	181	-	274	Teobromina	+	+
7	353	191	240, 325	Ácido 3-cafeoilquínico	+	+
8	353	191,179	240, 325	Ácido 5-cafeoilquínico	+	+
9	761	609, 305, 169	270	Galocatequina-(4 α →8)- epigalocatequina- 3'-O-galato	+	+
10	305	-	210, 270	(-)-Galocatequina	+	+
10A	913	743,573	743, 573	Teasinensis A	-	+
11	633	463,169	270	Strictinina	+	+
12	577	305	278	Dímero galocatequina	+	+
13	337	191, 163	310	Ácido 3- <i>p</i> -coumaroilquínico	+	+
14	483	331, 169	276	Digaloilglucose	+	+
15	745	593, 305, 169	276	Galocatequina catequinagalato	+	+
16	290	-	276	(+)-Catequina	+	+
17	577	289	278	Dímero galocatequina	+	+
18	457	305,169	213, 274	(-)-Galocatequina galato	+	+
19	353	191,173	240, 325	Ácido 4-cafeoilquínico	+	+
20 ^a	195	157	268	Cafeína	+	+
21	289	-	276	(-)-Catequina	+	+
22	457	305,169	213,274	(+)-Galocatequina galato	+	+
23	337	191, 163	310	Ácido 5- <i>p</i> -coumaroilquínico	+	+
24	609	305	272	Dímero de galocatequina	+	+
25	631	479, 317, 169	263,353	Miricetina-galoil-hexosídeo	+	+
26	635	483, 331, 169	278	Trigaloilglucose	+	+
27	441	289, 169	274	(+)-(-)-Catequina galato	+	+
28	447	285	266, 348	Caempferol-3-O-galactosídeo	+	+
29	787	625, 479, 317	262, 356	Miricetina-3-O-hexosil- rutinosídeo	+	+
30	447	285	266, 348	Caempferol-3-O-glucosídeo	+	+
31	609	457, 305, 169	272	(-)-Galocatequina-3,3'-di-O- galato	+	+
32	787	625, 479, 317	262, 356	Miricetina-3-O-hexosil-rutiósídeo	+	+
33	479	317	262, 354	Miricetina-3-O-galactosídeo	+	+
34	479	317	262, 354	Miricetina-3-O-glucosídeo	+	+
35	431	-	272, 336	Apigenina-C-glucosídeo	+	+

36	625	479, 317	262, 354	Miricetina 3-O-rutinosídeo	+	+
37	563	-	272, 336	Apigenina 6-C-arabinosil-8-C-glucosídeo	+	+
38	615	463, 301, 169	263, 353	Quercetina-galoil-hexosídeo	+	+
39	771	609, 463, 301	256, 354	Quercetina 3-O-galactosilrutinosídeo	+	+
40	431	285	256, 354	Caempferol-ramnosídeo	+	+
41	771	609, 463, 301	256, 354	Quercetina-3-O-glucosilrutinosídeo	+	+
42	463	301	258, 354	Quercetina-3-O-galactosídeo	+	+
43	599	447, 285, 169	263, 353	Caempferol-galoil-hexosídeo	+	+
44	609	463, 301	256, 354	Quercetina-3-O-ramnosilgalactosídeo	+	+
45	755	593, 447, 285	256, 354	Caempferol-3-O-galactosilrutinosídeo	+	+
46	599	447, 285, 169	263, 353	Caempferol-galoil-hexosídeo	+	+
47	755	593, 447, 285	266, 348	Caempferol-3-O-glucosilrutinosídeo	+	+
48	433	301	266, 348	Quercetina-pentosídeo	+	+
49	593	447, 285, 163	265, 347	Caempferol-3-O- <i>p</i> -coumaroil glucosídeo	+	+
49A	551	169	270, 372	Epiteaflagalina-3-galato	-	+
50	417	285	266, 354	Caempferol-pentosídeo	+	+
51	463	301	210, 256, 354	Quercetina-3-O-glucosídeo	+	+
51A	563	441	276, 376	Teflavina	-	+
51B	715	563, 169	276, 376	Teflavina-3-galato	-	+
51C	715	563, 169	276, 376	Teflavina-3'-galato	-	+
51D	867	563, 169	276, 376	Teaflavina-3-3'-digalato	-	+
52	593	447, 285, 163	260, 310	Caempferol-3-O-6"- <i>p</i> -coumaroilglucosídeo	+	+
53	1049	903, 771, 609, 463, 301, 163	266, 310	Quercetina-3-O-glucosil-ramnosil-(<i>p</i> -coumaroil-arabinosil) hexosídeo	+	-
54	901	755, 737, 301	266, 310	Quercetina-3-O- <i>p</i> -coumaroilramnosilhexosídeo	+	+
55	1049	901, 771, 609, 463, 301, 163	266, 310	Quercetina-3-O-glucosil-ramnosil-(<i>p</i> -coumaroil-arabinosil) hexosídeo	+	-
56	1033	885, 755, 593, 447, 285, 163	266, 310	Caempferol-3-O- <i>p</i> -coumaroil arabonosilglucosilramnosil gactosídeo	+	+
57	885	285	266, 310	Caempferol-3-O- <i>p</i> -coumaroilramnosil hexosídeo	+	+
58	1175	-	310	Não identificado	+	+
59	901	755, 737, 285	266, 310	Quercetina 3-O- <i>p</i> -coumaroilramnosilhexosídeo	+	+
60	1033	885, 755, 593, 447, 285, 163	266, 310	Caempferol-3-O- <i>p</i> -coumaroil arabinosilglucosilramnosil glactosídeo	+	+
61	885	285	266, 310	Caempferol-3-O- <i>p</i> -coumaroilramnosil hexosídeo	+	+

62	739	285	266, 316	Caempferol-3-O- <i>p</i> -coumaroilglucosilramnosídeo	+	+
63	781	285	266, 316	Caempferol-3-O-acetil-diramnosilhexosídeo	+	+
64	1170	-	310	Não identificado	+	+
65	1060	-	310	Não identificado	+	+
66	1215	1057,601,337, 193,99	ELSD/MS	Isômero florateasaponina A	+	-
67	1257	1099,601,337,193,99	ELSD/MS	Isômero foliateasaponina I	+	-
68	1215	1057,601,337, 193,99	ELSD/MS	Isômero florateasaponina A	+	-
69	1257	1099,601,337,193,99	ELSD/MS	Isômero foliateasaponina I	+	-
70	1263	1057,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B1 e B2	+	-
71	1257	1099,601,337,193,99	ELSD/MS	Isômero foliateasaponina I	+	-
72	1263	1057,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero Isoteasaponina B1 e B2	+	-
73	1215	1057,601,337, 193,99	ELSD/MS	Isômero florateasaponina A	+	-
74	1263	1057,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B1 e B2	+	-
75	1319	1113,615,337,193,147	ELSD/MS	Isômero assamsaponina J	+	-
76	1305	1099,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero foliateasaponina IV	+	-
77	1319	1113,615,337,193,147	ELSD/MS	Isômero assamsaponina J	+	-
78	1263	1057,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B1 e B2	+	-
79	1305	1099,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero foliateasaponina IV	+	-
80	1305	1099,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero foliateasaponina IV	+	-
81	1263	1057,601,337,193,147	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B1 e B2	+	-
82	1319	1113,615,337,193,147	ELSD/MS	Isômero assamsaponina J	+	-
83	1303	1057,601,337,193,147,99	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B3	+	-
84	1303	1057,601,337,193,147,99	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B3	+	-
85	1303	1057,601,337,193,147,99	ELSD/MS	Isômero isoteasaponina B3	+	-
86	555	299,255,225,95,81	ELSD/MS	SQMG (C16)	+	-
87 ^a	813	505,533,243,187,169	ELSD/MS	MGDG (C20:2/C18:2)	+	-
88 ^a	797	500,520,184,103	ELSD/MS	PC (C18:3/C19)	+	-
89 ^a	813	535,503,243,187,169	ELSD/MS	MGDG (C20:1/C18:3)	+	-
90	865	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	-
91	825	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	-
92	831	575,553,277,259,255	ELSD/MS	PI (C18:3/C16)	+	+
93 ^a	944	665,405,331,187,169	ELSD/MS	DGDG (C18:3/C18:3)	+	+
94	809	553,645,255,259	ELSD/MS	PI (C16/C16)	+	-
95	749	493,466,283,255,153	ELSD/MS	PG (C18/C16)	+	-
96	837	559,277,225,95,81	ELSD/MS	SQDG (C18:3/C18:3)	+	-
97 ^a	782	502,184,103	ELSD/MS	PC (C18:2/C18:2)	+	+
98 ^a	783	504,184	ELSD/MS	MGDG (C18:3/C18:3)	+	+
99 ^a	781	503,243,187,169	ELSD/MS	PC(C18:2/C16)	+	+
100 ^a	922	665,643,405,331,187,169	ELSD/MS	DGDG (C18:3/C16)	+	-

101^a	787	566,502,184	ELSD/MS	PC (C18:2/C18)	+	-
102^a	789	568,502,184	ELSD/MS	PC (C18:1/C18)	+	-
103	815	559,537,277,255,225,95, 81	ELSD/MS	SQDG (C18:3/C16)	+	+
104	817	561,537,279,255,225,95, 81	ELSD/MS	SQDG (C18:2/C16)	+	+
105	819	563,537,281,255,225,95, 81	ELSD/MS	SQDG (C18:1/C16)	+	-
106	793	537,255,225,95,81	ELSD/MS	SQDG (C16/C16)	+	-
107	793	565,509,283,227,225,95, 81	ELSD/MS	SQDG (C14/C18)	+	+
108	820	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	+
109^a	767	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	-
110	627	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	-
111	528	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	+
112	891	-	ELSD/MS	Lípídeo não identificado	+	+

^a Identificados em modo positivo no ESI-MS.

Contudo, mesmo com a realização do fracionamento líquido-líquido, ainda foi observado que alguns picos coeluíram, dificultando a análise (ex.: picos **2** e **3**; picos **15**, **16** e **17**; picos **18** e **19**; picos **27**, **28**, **29** e **30**, **40**, **41** e **42**, entre outros, Figuras 22-30). A sobreposição de picos, associada com a supressão de íons no MS, causada pelos componentes majoritários das matrizes é comum em amostras fitoquímicas, resultando em problemas sérios em análises quantitativas. Na tentativa de resolver essas superposições, a cromatografia líquida bidimensional foi aplicada

6.4.4 Metodologia de cromatografia líquida bidimensional abrangente.

A cromatografia líquida bidimensional é considerada abrangente quando todo o efluente da primeira dimensão de separação, e não somente uma região selecionada, é submetido a nova separação em um segundo sistema cromatográfico (SCHOENMAKERS *et al.*, 2006; DUGO *et al.*, 2008). Os cromatogramas podem ser plotados como um gráfico de contorno para expor os componentes de toda a amostra. Este gráfico pode ser usado para criar um mapa metabólico, o qual pode representar condições experimentais, possibilitando desenvolver, desta forma, metodologias para amostras que são submetidas a diferentes processamentos, como ocorre na preparação de chás verde e preto.

Considerando a complexidade da matriz de *C. sinensis*, foi desenvolvido um sistema *offline*, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com uma coluna de exclusão por tamanho (SEC) na primeira dimensão, pois em trabalho anterior, esta forneceu uma boa separação de flavonóis glicosídeos em uma abordagem bidimensional (SOUZA *et al.*, 2009). Frações de 1 ml foram coletadas e a segunda dimensão de análise foi executada utilizando um sistema UHPLC com uma coluna de fase reversa (BEH-C18)

6.4.5 Análise dos compostos de baixa massa molecular por cromatografia bidimensional abrangente

A maior resolução dos picos e, conseqüentemente, a capacidade de resolver uma matriz mais complexa, é o benefício principal da LC bidimensional empregada na análise dos compostos de *C. sinensis*. Assim, os compostos que não foram distinguidos na análise unidimensional foram separados e identificados pela análise bidimensional, conseqüentemente gerando resultados mais confiáveis. Além disso, os cromatogramas plotados em gráficos 2D permitiram correlacionar a posição de cada composto como função de dois tempos de retenção, minimizando interferências das matrizes e interpretações equivocadas.

Apesar da existência de tipos diferentes de compostos presentes nos extratos dos chás verde e preto, bem como a baixa abundância desses compostos, as análises com a coluna SEC forneceram bons resultados. Como esperado, os compostos foram eluídos principalmente na ordem decrescente do peso molecular, o que permitiu que compostos que coeluíram na análise unidimensional (ex.: picos **18** e **19**; **27**, **28**, **29** e **30**; e picos **40**, **41** e **42**) fossem distinguidos e bem resolvidos na análise bidimensional. Os flavonóides e seus correspondentes glicosídeos tiveram interações notáveis com a matriz da coluna SEC (Figura 31 A-C). Isto já foi anteriormente relatado para os flavonóis glicosídeos presentes em *Maytenus ilicifolia*, nos quais a coluna SEC Ultrahydrogel 120 (Waters) foi capaz de distinguir muitos compostos, inclusive isômeros (SOUZA *et al.*, 2009).

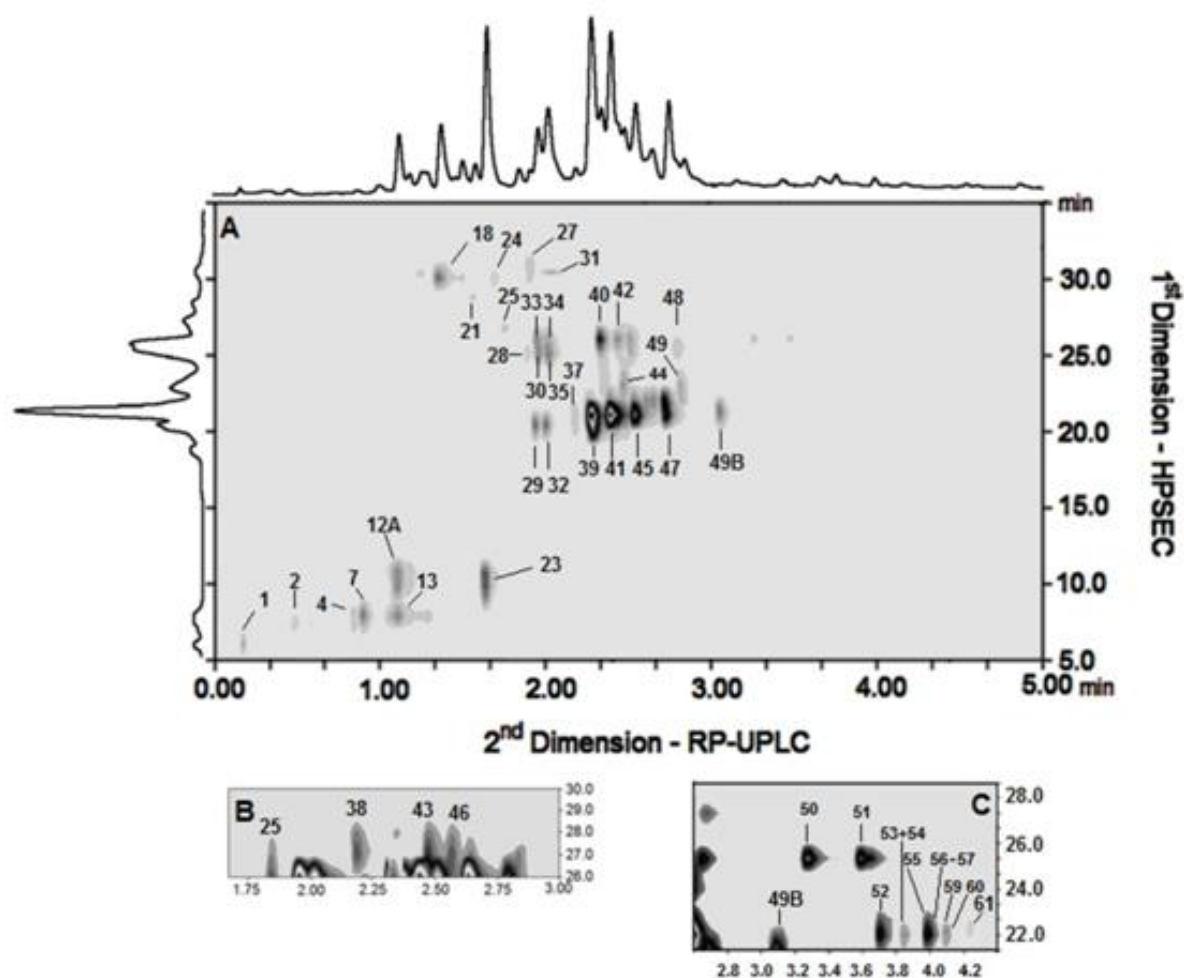


FIGURA 31 - GRÁFICOS PLOTADOS 2D SEC X UHPLC DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO CHÁ VERDE OBTIDO EM 325 NM MOSTRANDO PRINCIPALMENTE: (A) COMPOSTOS FENÓLICOS, (B) REGIÃO DOS PICOS 25, 38, 43 E 46, OS NOVOS FLAVONÓIS GLICOSÍDEOS; E (C) REGIÃO DOS COMPONENTES MINORITÁRIOS.

Os flavanóis e as xantinas foram melhor visualizados em 275 nm (Figura 32 A). Já os oligossacarídeos (di- e trissacarídeos) eluíram durante os 10 minutos iniciais, sendo detectados por ESI-MS na forma de íons litiados, com m/z 349 e 511, respectivamente (Figura 32 B). Independentemente de suas massas moleculares, muitos outros compostos tiveram maiores tempos de retenção que os oligossacarídeos na primeira dimensão, contrariando as bases da separação por SEC.

Muitos fatores podem ter exercido influência na separação observada, como a polaridade dos compostos e, conseqüentemente, a sua solubilidade nos

solventes de separação, que devem ser considerados como fatores importantes, uma vez que a separação foi realizada em gradiente de solventes utilizando água e acetonitrila. Contudo, a detecção por MS e ELSD mostrou que lipídeos (como SQDG, m/z 815, o principal lipídeo detectado no modo negativo) eluíram com tempos de retenção próximos de 22 minutos na SEC (Figura 32 C, Tabela 5, página 88). Observou-se também que flavonóis triglicosídeos (ex. m/z 755 e 771) eluíram próximo aos lipídeos (Tabela 5, página 87). Adicionalmente, muitas saponinas, que variam em peso molecular (1216 – 1320 Da) também eluíram próximo dos lipídeos e flavonóis triglicosídeos (SEC) (Figura 32 C, Tabela 5). Assim, considerando que a polaridade de flavonol glicosídeos, saponinas e lipídeos é distinta, a solubilidade no solvente não foi o fator principal que levou a separação observada por SEC. Notavelmente, os componentes principais de *C. sinensis*, os flavan-3-ols (catequinas), eluíram perto de 30 minutos, demonstrando sua interação com a coluna.

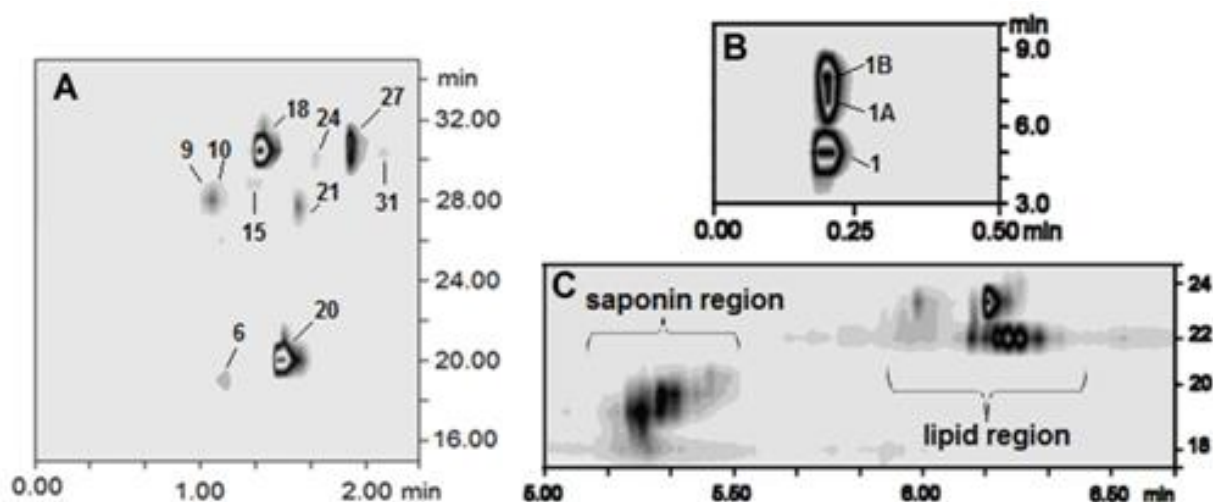


FIGURA 32 - CROMATOGRAMA 2D (A) COM DETECÇÃO EM 275 nm, MOSTRANDO OS FLAVAN-3-OLS E AS XANTINAS. OS CROMATOGRAMAS 2D OBTIDOS COM ELSD MOSTRARAM: (B) ÁCIDO QUÍNICO E OLIGOSSACARÍDEOS E (C) SAPONINAS E LIPÍDEOS.

Os principais produtos da oxidação da *C. sinensis* (teaflavinas do chá preto), como detectados pelas análises por SEC, eluíram após 30 min e foram separados de acordo com seus pesos moleculares: teaflavina 3,3'-digalato (Rt 31,28 min, m/z 867), teaflavina 3- e 3'-galato (Rt 32,68 min, m/z 715) e teaflavina (Rt 33,18 min, m/z 563).

Por outro lado, para os ácidos clorogênicos, encontrados principalmente no chá preto, foram observados menores tempos de retenção na coluna SEC. Sendo compostos de baixas massas moleculares (354 Da), esperava-se que estes apresentassem tempo de retenção maiores, porém estes compostos eluíram em 8,5 e 8,86 min (Figura 33). As características acídicas desses compostos podem ser a razão principal da baixa interação com a matriz de SEC, como foi observado também para o ácido quínico, o qual teve um valor de Rt de 5,55 min.

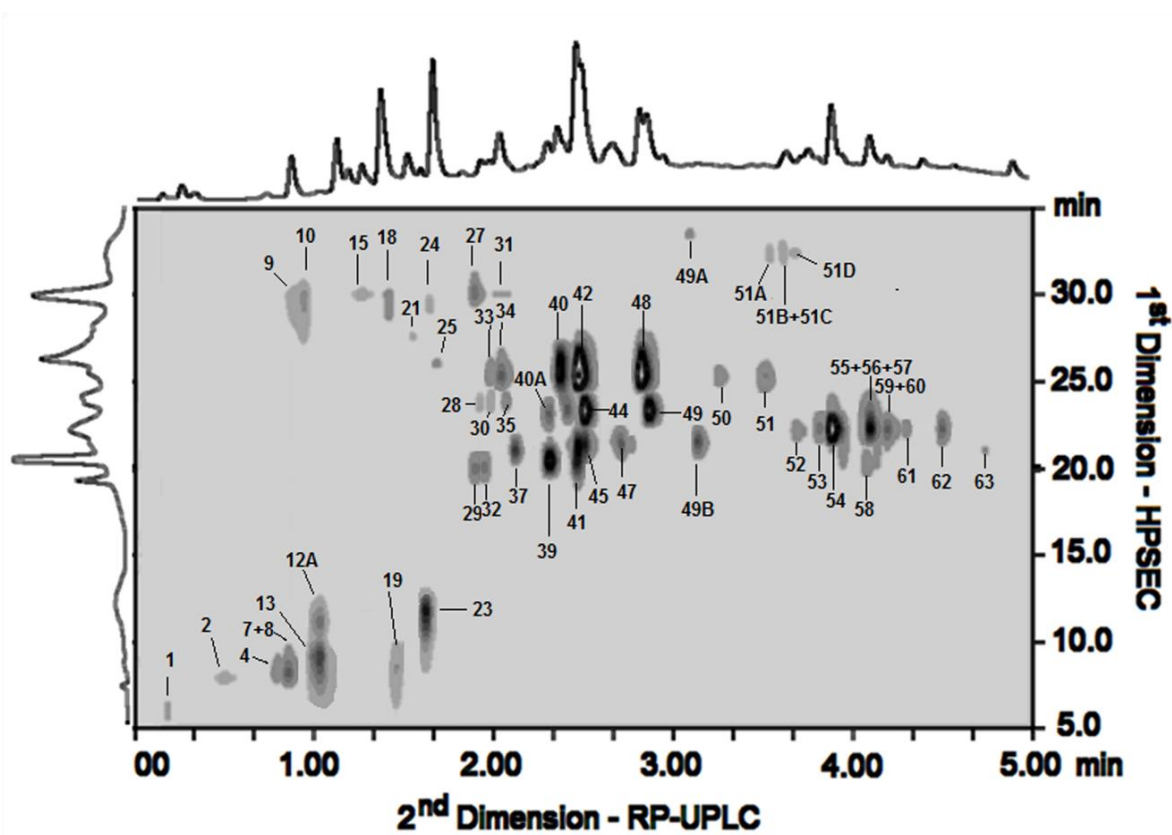


FIGURA 33 - GRÁFICO 2D SEC x RP-UHPLC DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO CHÁ PRETO OBTIDO EM 325 nm.

TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PELA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL (2D-LC).

Pico	<i>Rt</i> ₁	<i>Rt</i> ₂	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	Composto
1	5,50	0,21	191	Ácido quínico
1A	7,30	0,22	511	Trissacarídeo
1B	7,94	0,22	349	Dissacarídeo
2	7,49	0,41	343	Ácido 3-galoilquínico
3	18,54	0,41	331	Galoil glucose
4	8,41	0,91	343	Ácido 5-galoilquínico
5	27,08	1,05	305	Galocatequina
6 ^a	17,92	1,10	181	Teobromina
7	8,5	0,80	353	Ácido 3-cafeoilquínico
8	8,5	0,89	353	Ácido 5-cafeoilquínico
9	28,09	0,98	761	Galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3'-O-galato
10	28,28	1,10	305	Epigalocatequina
10B	25,91	1,15	913	Teasinensis A
11	25,75	1,20	633	Strictinina
12	26,10	1,24	577	Dimero de galocatequina
12A	10,71	1,10	343	Ácido 4-galoilquínico
13	8,25	1,10	337	Ácido 3- <i>p</i> -coumaroilquínico
14	17,94	1,33	483	Digaloilglucose
15	29,10	1,35	745	Galocatequina catequinagalato
16	27,77	1,39	289	(+)-Catequina
17	26,50	1,40	577	Dimero de galocatequina
18	30,45	1,41	457	(-)-Galocatequina galato
19	8,86	1,41	353	Ácido 4-cafeoilquínico
20 ^a	20,0	1,55	195	Cafeína
21	27,77	1,56	289	(-)-Catequina
22	30,45	1,57	457	(+)-Galocatequina galato
23	11,66	1,61	337	Ácido 5- <i>p</i> -coumaroilquínico
23A	30,39	1,66	441	(+)-Catequina galato
24	29,70	1,69	609	Dimero de galocatequina
25	25,88	1,85	631	Miricetina-galoil-hexosídeo
26	18,79	1,89	635	Trigaloilglucose
27	30,56	1,93	441	(-)-Catequina galato
28	23,35	1,93	447	Caempferol-3-O-galactosídeo
29	20,31	1,97	787	Miricetina-3-O-galactosilrutinosídeo
30	23,47	1,97	447	Caempferol-3-O-glucosídeo
31	30,24	2,01	609	Epigalocatequina-3,3 di-O-galato

32	20,37	2,01	787	Miricetina-3- <i>O</i> -glucosilrutinosídeo
33	24,8	2,01	479	Miricetina-3- <i>O</i> -galactopiranosídeo
34	24,99	2,05	479	Miricetina-3- <i>O</i> -glucopiranosídeo
35	24,04	2,10	431	Apigenina-8/6- <i>C</i> -glicosídeo
36	22,12	2,10	625	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosilhexosídeo
37	21,13	2,20	563	Apigenina-6- <i>C</i> arabinosil-8- <i>C</i> -glucosídeo
38	27,84	2,21	615	Quercetina-galoil-hexosídeo
39	20,5	2,29	771	Quercetina-3- <i>O</i> -galactosilrutinosídeo
40	25,23	2,29	431	Caempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo
40A	21,29	2,33	563	Apigenina-6- <i>C</i> arabinosil-8- <i>C</i> -glucosídeo
41	20,75	2,41	771	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosilrutinosídeo
42	25,05	2,43	463	Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo
43	27,90	2,49	599	Caempferol-galoil-hexosídeo
44	22,46	2,49	609	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosilgalactosídeo
45	21,07	2,57	755	Caempferol-3- <i>O</i> -galactosilrutinosídeo
46	28,09	2,69	599	Caempferol-galoil-hexosídeo
47	21,26	2,77	755	Caempferol-3- <i>O</i> -glucosilrutinosídeo
48	24,33	2,83	433	Quercetina-pentosídeo
49	22,65	2,85	593	Caempferol-3- <i>O</i> - <i>p</i> -comaroil-glucosídeo
49A	34,66	3,13	551	Epiteaflagalina-3-galato
49B	22,21	3,17	625	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnonilhexosídeo
50	25,81	3,29	417	Caempferol-pentosídeo
51	25,24	3,45	463	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo
51A	33,18	3,58	563	Teflavina
51B	32,68	3,62	715	Teflavina-3-galato
51C	32,71	3,64	715	Teflavina-3'-galato
51D	31,28	3,67	867	Teflavina-3-3'-digalato
52	22,84	3,68	593	Caempferol-3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-glucosídeo
53	21,70	3,77	1049	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosil-ramnosil-(<i>p</i> -coumaroil-arabinosil) hexosídeo
54	22,71	3,82	901	Quercetina-3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-diramnosil-glicosídeo
55	21,83	4,01	1049	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosil-ramnosil-(<i>p</i> -coumaroil-arabinosil) hexosídeo
56	22,02	4,05	1033	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosil-ramnosil-(<i>p</i> -coumaroil-arabinosil) hexosídeo
57	22,78	4,09	885	Caempferol 3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-diramnosil-glicosídeo
58	20,05	4,11	1175	Não identificado
59	22,71	4,13	901	Quercetina 3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-diramnosil-glicosídeo
60	22,14	4,13	1033	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosil-ramnosil-(<i>p</i> -coumaroil-arabinosil) hexosídeo
61	22,78	4,25	885	Caempferol 3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-diramnosil-glicosídeo
62	23,09	4,49	739	Caempferol 3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroil-ramnosil-glicosídeo
63	20,25	4,69	781	Caempferol-3- <i>O</i> -acetil-diramnosil-hexosídeo

64	20,05	4,89	1170	Não identificado
65	20,05	4,99	1060	Não identificado
66	18,98	5,01	1215	Isômero florateasaponina A
67	18,73	5,01	1257	Isômero foliateasaponina I
68	18,98	5,05	1215	Isômero florateasaponina A
69	18,73	5,05	1257	Isômero foliateasaponina I
70	20,03	5,09	1263	Isômero isoteasaponina B1/B2
71	18,73	5,10	1257	Isômero foliateasaponina I
72	20,03	5,17	1263	Isômero isoteasaponina B1/B2
73	18,98	5,17	1215	Isômero florateasaponina A
74	20,03	5,25	1263	Isômero Isoteasaponina B1/B2
75	19,80	5,25	1319	Isômero assamsaponina J
76	19,36	5,25	1305	Isômero foliateasaponina IV
77	19,80	5,29	1319	Isômero assamsaponina J
78	20,03	5,33	1263	Isômero isoteasaponina B1/B2
79	19,36	5,40	1305	Isômero foliateasaponina IV
80	19,36	5,45	1305	Isômero foliateasaponina IV
81	20,03	5,57	1263	Isômero isoteasaponina B1/B2
82	19,80	5,65	1319	Isômero assamsaponina J
83	19,39	5,67	1303	Isômero isoteasaponina B3
84	19,39	5,69	1303	Isômero isoteasaponina B3
85	19,39	5,81	1303	Isômero isoteasaponina B3
86	20,69	5,90	555	SQMG (C16)
87^a	24,79	5,95	813	MGDG (C20:2/C18:2)
88	25,51	5,99	797	PC (C18:3/C19)
89^a	24,91	6,10	813	MGDG (C20:1/C18:3)
90	19,69	6,15	865	Lipídeo não identificado
91	19,71	6,15	825	Lipídeo não identificado
92	20,31	6,15	831	PI (C18:3/C16)
93^a	25,04	6,15	944	DGDG (C18:3/C18:3)
94	24,42	6,17	809	PI (C16/C16)
95	21,26	6,17	749	PG (C18/C16)
96	19,61	6,17	837	PG (C18/C16)
97^a	25,68	6,19	782	PC (C18:2/C18:2)
98^a	25,68	6,19	783	MGDG (C18:3/C18:3)
99^a	25,68	6,19	781	PC (C18:2/C16)
100^a	25,42	6,21	922	DGDG (C18:3/C16)
101^a	25,61	6,21	787	PC (C18:2/C18)
102^a	25,61	6,23	789	PC (C18:1/C18)
103	19,80	6,25	815	SQDG (C18:3/C16)

104	19,80	6,25	817	SQDG (C18:2/C16)
105	19,80	6,25	819	SQDG (C18:1/C16)
106	19,80	6,23	793	SQDG (C14/C18)
107	20,34	6,33	793	SQDG (C14/C18)
108	20,32	6,35	820	Lipídeo não identificado
109	25,71	6,35	767	Lipídeo não identificado
110	21,32	6,40	627	Lipídeo não identificado
111	21,45	6,45	528	Lipídeo não identificado
112	20,31	6,45	891	Lipídeo não identificado

^a Detectados em modo positivo no ESI-MS.

A segunda dimensão, baseada em um modo 2D-LC abrangente, foi executada no UHPLC. Este método foi mais rápido do que a utilização da RP no gradiente da metodologia unidimensional, devido a taxa de fluxo maior utilizada ($1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), permitido devido à menor complexidade de cada fração obtida da primeira dimensão. O uso de tal fluxo em coluna de tamanho de partícula reduzido ($1,7 \mu\text{m}$) pode gerar altas pressões na coluna, impedindo as análises. Para compensar este problema, metodologias recentes estão utilizando altas temperaturas, resultando em uma redução na viscosidade do solvente e, conseqüentemente, uma redução nas pressões (DUGO *et al.*, 2008).

Assim, no método de separação bidimensional, a segunda dimensão foi desenvolvida a uma temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (compatível com os limites da coluna) gerando uma pressão menor do que 11.000 psi ($\sim 750 \text{ bar}$), também compatível com os limites de coluna. Neste sistema, nenhuma degradação na fase estacionária da coluna foi observada, considerando que não houve modificações na resolução e no poder de separação após o término das análises.

Embora os principais compostos (tipicamente os fenólicos) eluíssem antes de 3 min, para se ter uma análise abrangente de todos os fitoquímicos, a segunda dimensão foi estendida para 8 min, com a finalidade de incorporar as saponinas e os lipídeos, que apresentam alta retenção na coluna de fase reversa. Isso pode prejudicar as análises por 2D-LC abrangentes, razão pela qual optou-se por análise *offline*, onde as amostras são coletadas, secas e então reinjetadas na segunda dimensão.

Os cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de *C. sinensis* (chá verde e preto) foram plotados em gráficos de contorno 2D. Conseqüentemente, a

diferença devido a presença de produtos de oxidação no chá preto foi evidente (Figura 33). Como descrito, a modificação principal na composição de chá preto, com relação ao chá verde, é a presença das teaflavinas condensadas. Contudo, outras modificações foram observadas, como o desaparecimento das saponinas e uma redução drástica no conteúdo de lipídeos, bem como de alguns flavonóis glicosídeos.

Assim, de forma análoga a um gel de electroforese 2D, os gráficos gerados da cromatografia líquida bidimensional podem ser usados para desenhar um mapa metabólico abrangente, como observados aqui para chá verde e chá preto provenientes da *C. sinensis* (Figuras 31, 32 e 33).

6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA

A maior parte das atividades biológicas das plantas medicinais é atribuída aos metabólitos secundários, como os compostos fenólicos. Desta forma, avaliou-se a atividade gastroprotetora dos extratos hidroalcoólicos em ambos os chás.

Os tratamentos, via oral, com **V-Et70** e **P-Et70** reduziram significativamente a ocorrência de lesão gástrica induzida por etanol (Figura 33), sugerindo uma habilidade potencial destes compostos atuarem como agentes citoprotetores diretos. O tratamento com **V-Et70** na dose de 100 mg/kg reduziu os danos gástricos por etanol P.A, com uma DE_{50} de 3,6 mg/kg (controle = $14,5 \pm 4,5 \text{ mm}^2$, média \pm desvio padrão). O extrato do chá preto também apresentou atividade gastroprotetora, onde as doses de 100 mg/kg de **P-Et70** reduziram as lesões gástricas em 73%, neste caso todas as doses utilizadas reduziram as lesões em menos de 50%. A ação protetora de ambos os extratos contra lesões gástricas provocadas por etanol pode ser visualizada na Figura 34.

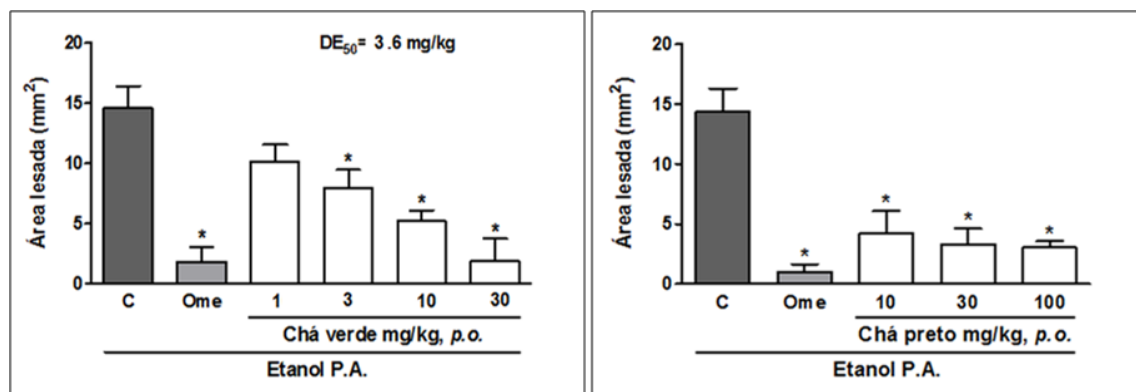


FIGURA 34 - EFEITO PROTETOR DE **V-Et70** (1, 3, 10 E 30 mg/kg, *P.O.*), E **P-Et70** (10, 30 E 100 mg/kg, *P.O.*) CONTRA LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETOH (C: CONTROLE, H₂O 0,1 ml/100 g, *P.O.* E OME: OMEPRAZOL 40 mg/kg, *P.O.*). OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO MÉDIO PADRÃO (N = 6). COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA FOI REALIZADA USANDO ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) SEGUIDA PELO TESTE DE BONFERRONI. **P* < 0,05 QUANDO COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.

Alguns dos possíveis mecanismos para o efeito protetor antiúlcera são: atividade antissecretora de suco gástrico, proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco e defesas antioxidantes (MATSUMOTO *et al.*, 1993; NERGARD *et al.*, 2005; YAMADA, 1994). Considerando que os flavonóides são potentes seqüestradores de radicais livres (antioxidantes) (BORELLI *et al.*, 2000; COOPER *et al.*, 2005a e 2005b), estes compostos são candidatos diretos a responsáveis pelos efeitos observados, já que estes estavam concentrados nos extratos hidroalcoólicos do chá verde e chá preto.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- Os polissacarídeos obtidos pelo fracionamento por congelamento e degelo do extrato aquoso do chá verde (**V-Sol-GD**) foram identificados como uma estrutura péctica composta de ácido poligalacturônico (1→4)-ligados e unidades de galactose (1→3) e (1→6)-ligadas. Quanto ao chá preto (**P-Sol-GD**) foram caracterizados como uma estrutura péctica constituída principalmente de ácido galacturônico na cadeia principal, e a presença de uma arabinogalactana. Observou-se uma variação na quantidade de monossacarídeos presentes nesses dois tipos de chás, sugerindo que o processamento pode estar alterando a estrutura dos polissacarídeos.
- As frações solúveis no congelamento e degelo de ambos os chás apresentaram efeito significativo na avaliação da atividade antissepe.
- Utilizando-se o particionamento líquido-líquido na análise unidimensional (1D), várias classes de compostos de baixa massa molecular foram identificados. Além disso, foram encontrados compostos que ainda não haviam sido relatados em *C.sinensis*, que são os isômeros das saponinas e os flavonóis glicosídeos contendo ésteres de ácido gálico.
- A combinação do HPLC (SEC) e UHPLC (RP) forneceu a ortogonalidade requerida para sistemas bidimensionais. A análise por UHPLC é muito mais rápida que a tradicional por HPLC, tornando o sistema bidimensional eficiente para análise na segunda dimensão, sendo que o tempo reduzido desta segunda dimensão tem um papel chave na cromatografia líquida bidimensional (2D-LC).
- A análise comparativa mostrou que os chás apresentam diferenças significativas em sua composição, principalmente causadas pelo processo oxidativo a que as folhas são submetidas durante o processamento. Esta diferença inclui a presença das teaflavinas, ausência das saponinas e redução no conteúdo de lipídeos observadas para o chá preto.
- Os extratos hidroalcoólicos do chá verde e do chá preto apresentaram atividade antiúlcera gástrica, indicando que estes extratos tem papel importante no efeito biológico da *C. sinensis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonoids: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scientific American**, v. 232, p. 80-94, 1975.

ALMEIDA, E. R. **As plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993. 339p.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia: organismo**. São Paulo: Moderna, 1994. 155p.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. **Plant Biochemistry**, New York: Academic Press., p. 143, 169, 177, 191, 192, 1997.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BALADRIN, M. F.; KLOKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLINGE, W. H. Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p. 1054-1060, 1985.

BALENTINE D. A.; WISEMAN S. A.; BOUWENS L. C. The chemistry of tea flavonoids. **Criticals Review in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 693-704, 1997.

BLAHOVA, E.; JANDERA, P.; CACCIOLA, F.; MONDELLO, L. Two-dimensional and serial column reversed-phase separation of phenolic antioxidants on octadecyl-, polyethyleneglycol-, and pentafluorophenylpropyl-silica columns. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 555-566, 2006.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591. 2000

BRETT; C.; WALDRON, K. Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls., **Unwin Hyman**, v. 114, p. 1-3, 1990.

BRUNETON, J. J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris Lavoisies, p. 885-886, 1996.

- CACCIOLA, F.; JANDERA, P.; BLAHOVÁ, E.; MONDELLO, L. Development of different comprehensive two dimensional systems for the separation of phenolic antioxidants. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 2500-2513, 2006.
- CACCIOLA, F.; JANDERA, P.; HAJDU, Z.; ČEŠLA, P.; MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, p.73-87, 2007.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Ciência e Cultura Temas e tendências SBPC**, v. 55, p. 37-39, 2003.
- CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. J. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 29, p. 503-509, 1997.
- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.
- CAVALCANTI, A. S. S.; ROSA, J. A. B.; LIMA, M. S. C. S.; SILVA, A.G. Uso do chá verde, *Camellia sinensis* L. (Theaceae) em produtos tópicos – uma revisão. **Revista Natureza on line**, v. 5, n. 2, p. 76-84, 2010
- CHAPMAN, D.; BARBER, J. Polar lipids of chloroplast membranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p. 294-319, 1987.
- CHANTRE, P.; LAIRON, D. Recent findings of Green tea extract AR25(Exolise) and its activity for the treatment of obesity. **Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3-8, 2002.
- CHEN, X.; KONG, L.; SU, X.; FU, H.; NI, J.; ZHAO, R.; ZOU, H. Separation and identification of compounds in *Rhizoma chuanxiong* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p.169-178, 2004.
- CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 703-706, 2004.
- CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.
- COLLINS, F. W.; BOHM, B. A.; WILKINS, C. K.; Flavonol glycoside gallates from *Tellima grandiflora*. **Phytochemistry**, v.14, p.1099-1102, 1975.

COOPER, R.; MORRÉ, J.; MORRÉ, D. Medicinal Benefits of Green Tea: Part I. Review of Noncancer Health Benefits. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n 3, p. 521–528, 2005a.

COOPER, R.; MORRÉ, J.; MORRÉ, D. Medicinal Benefits of Green Tea: Part II. Review of Anticancer Properties **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n 4, p. 639–652, 2005b.

CUI, S. W. **Structural analysis of polysaccharides**. In Steve W. Cui (Ed.), *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties and applications* (1 edition). Boca Raton, FL: CRC Press.; p. 677-681, 2005

DAVIES, A. P.; GOODSALL, C.; CAI, Y.; DAVIS, A.; LEWIS, J. R.; WILKINS, J. Black tea dimeric and oligomeric pigments –structures and formation. In: Wilson A, Clifford NN, editors. **Plant polyphenols 2. Chemistry, Biology, Pharmacology and Ecology**, London: Chapman and Hall; p. 555–601, 1992.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudates: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 167-175, 1999.

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. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.52, p. 2807-2815, 2004.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. UNESP. p. 230-232, 1995.

DUARTE, R. M.; MENARIM, O. D. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis*(L) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 545-551, 2006.

DUGO, P.; FAVOINO, O.; LUPPINO, R.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional normal-phase (adsorption)-reversed-phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v.76, p. 2525-2530, 2004.

DUGO, P.; CACCIOLA, F.; KUMM, T.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 353–368, 2008.

EL-SHEMY, H. A.; ABOUL-ENEIN, A. M.; ABOUL-ENEIN, K. M.; FUJITA, K. Willow leaves' extracts contain anti-tumor agents effective against three cell types. **Plos one**, v. 2, p.178-183, 2007.

ENGELHARDT, U.H. Chemistry of Tea. **Comprehensive Natural Products II**, p. 999-1032, 2010.

ESCARPA, A.; GONZÁLES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Cleveland, v. 31, p. 57-139, 2001

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant. **Il Farmaco**, v. 56, p. 397–401, 2001.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 1998. 131p.

FINGER, A.; KUHR, S.; ENGELHARDT, U. H. Chromatography of tea constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 624, p. 293-315, 1992.

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; AMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 539-547, 2000.

GONG, Z.; WATANABE, N.; YAGI, A.; ETOH, H.; SAKATA, K.; INA, K.; LIU, Q. Compositional change of Pu-erh tea during processing. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p.1745-1746, 1996.

GONZALEZ, E.; RAMIREZ-MARES, M.; PUANGPRAPHANT, S. Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 721–731, 2009.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v.142, p. 119-132, 1984.

GRUENWALD, J. **PDR for Herval Medicines**. USA: Medical Economics Company, ed. 2, 2000. 557p.

GUILLARME, D.; CASETTAB, C.; BICCHIB, C.; VEUTHEYA, J. High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 1217,p. 6882–6890, 2010.

HAMPTON, M. G. **Production of Black Tea**. In Tea: Cultivation to Consumption; K. C. Willson, M. N. Clifford, Eds.; Chapman & Hall: London, 1992; 459–511p.

HAROLD N. G. Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. **Preventive Medicine**, v. 21, p. 334-350, 1992.

HELDT, H. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**, University Press: Oxford, 1997. 297p.

HENDERSON, L.; GREGORY, J.; SWAN, G. **National diet and nutrition survey: adults age 19 a 64 years**. London: FSA; 2002. 334p.

HU, L.; CHEN, X.; KONG, L.; SU, X. ; YE, M.; ZOU, H. Improved performance of comprehensive two-dimensional HPLC separation of traditional Chinese medicines by using a silica monolithic column and normalization of peak heights. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, p. 191, 2005.

HUANG, K. C. **The pharmacology os Chinese Herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 447p.

IKEGAMI, T.; HARA, H.; KIMURA, H.; KOBAYASHI, K.; HOSOYA, K.; CABRERA, N.; TANAKA, T. Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions. **Journal of Chromatography A**, v.1106, p.112, 2006.

KARORI, S. M.; WACHIRA, F. N.; WANYOKO, J. K.; NGURE, R. M. Antioxidant capacity of different types of tea products. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2287-2296, 2007.

KHAN N.; MUKHTAR H. Tea polyphenols for health promotion, **Life Science**, v. 81, p. 519-33, 2007.

KIM, G.Y.; ROH, S.I.; PARK, S.K.; AHN, S.C.; OH, Y.H.; LEE, J.D.; PARK, Y.M. Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p. 1418-1423, 2003

KIVILOMPOLO, M.; HYOTYLAINEN, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 155-164, 2007.

KOHNE, A. P.; DORNBERGER, U.; WELSCH, T. Two-dimensional high performance liquid chromatography for the separation of complex mixtures of explosives and their by-products. **Chromatographia**, v. 48, p. 9-16, 1998.

KOHNE, A. P.; WELSCH, T. J. Coupling of a microbore column with a column packed with non-porous particles for fast comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 845, p. 463-469, 1999.

LANDRY, D. W.; OLIVER, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 588-595, 2001.

LAPA, A. J.; CADEN, S.; LANDMAN , M. T. R. L.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacologica de Plantas Mediciniais**. v.1, 2003.

LAZARO, E. P. PEREZ. Arquivo acessado em 02/11/2010, às 19:30, disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>.

LEE, S.; PARK, M. K.; KIM, K. H.; KIM, Y. S. Effect of Supercritical Carbon Dioxide Decaffeination on Volatile Components of Green Teas. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 497-502, 2007

LEE M. J.; PRABHU, S.; MENG, X. L, C.; YANG, C. S. An Improved Method for the Determination of Green and Black Tea Polyphenols in Biomatrices by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Array Detection. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p.164-169, 2000.

LIN, L.; CHEN, P.; HARNLY, J. New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.56, p. 8130–8140, 2008.

LI, B. Q.; ZHANG, H. L.. Studies on the extraction of polysaccharide from middle and lower middle grade green tea and the effectiveness on bloodglucose depressing. **Journal of Tea Science**, v.1, p. 67-72, 1996.

LUNDER, T. Tannins of green and black tea: Nutritional value, physiological properties and determination. **Farmaceutisch Tijdschr Belgien**, v.3, p. 66-69, 1989.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolic**, Boca Raton: CRC Press., 1990. 378p.

MACKENZIE, T.; LEARY, L.; BROOKS, W. B. The effect of an extract of green and black tea on glucose control in adults with type 2 diabetes mellitus: double-blind randomized study. **Metabolism**, v. 56, p. 1340-1344, 2007.

MAHANTA, P. K. **Colour and Flavour Characteristics of Made Tea**. In Modern Methods of Plant Analysis – New Series; H. F. Linskens, J. F. Jackson, Eds.; Springer Verlag: New York; v. 8, p. 221–295, 1988.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS JE. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV; 2000. 145p.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by hydrochloric acid/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 535-539, 1993.

MATSUY, Y.; KOBAYASHI, K.; MASUDA, H.; KIGOSHI, H.; AKAO, M.; SAKURAI, H.; KUMAGAI, H. Quantitative Analysis of Saponins in a Tea-Leaf extract and Their Antihypercholesterolemic Activity. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 73, p. 1513-1519, 2009.

MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G. L.; SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted α -xylan of the gum exudate of the palm *Livistonia chinensis* (chinese fan). **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1843- 1850, 2003.

MONDELLO, L.; TRANCHIDA, P. Q; STANEK, V. ; JANDERA, P.; DUGO, G.; DUGO, P. Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 91-98, 2005.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

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

NIE, S. P.; XIE, M. Y.; FU, Z. H.; WAN, Y. Q.; YAN, A. P. Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 626-633, 2008.

NIE, S. P., XIE, A. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 144-149, 2011.

NOVAKOVA, L.; SPACIL, Z.; SEIFRTOVA, M.; OPLETAL, L.; SOLICHA, P. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. **Talanta**, v. 80, p.1970–1979, 2010.

OKADA, S., TAKAHASHI, N., OHARA, N., UCHIMURA, T., KOZAKI, M. Microorganisms involving in the fermentation of Japanese fermented tea leaves. II. Microorganisms in fermentation of Goishi-cha, Japanese fermented tea leaves. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 43, p. 1019-1027, 1996.

OWUOR, P. O. TEA – **Processing**. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). 2003, 5752-5757p.

PAULSEN, B. S., 2001, Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current Organic Chemistry**, v. 5, p. 939-950, 2001.

PENG, Z. F.; STRACK, D.; BAUMERT, A.; SUBRAMANIAM, R.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; TAN, S. N.; CHIA L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry**, v. 62, p. 219-228, 2003.

PICCIN, E. **Determinação de polifenóis totais utilizando sistemas de análises por injeção em fluxo**. 98p. Dissertação(mestrado em Química)-Centro

de Ciências Exatas e de Tecnologia, universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

POL, J.; HOHNOVA, B.; HYOTYAINEN, T. Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 85-92, 2007.

PONGSUWAN, W.; BAMBA, T.; HARADA, K.; YONETANI, T.; KOBAYASHI, A.; FUKUSAKI, E. High-Throughput Technique for Comprehensive Analysis of Japanese Green Tea Quality Assessment Using Ultra-performance Liquid Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC/TOF MS). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 10705–10708, 2008.

REID, J. S. G. **Plant Biochemistry**. New York: Academic Press. 1997. 205-212p.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

RUTHES, A. C.; RATTMANN, Y. D.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1620-1627, 2011.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Sulfonoglycolipids from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*: isolation, NMR, and ESI-MS approaches. **Glycobiology**, v. 11, p. 345-351, 2001b.

SCHMITZ, W.; SAITO, A. Y.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKI, H. O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SCHOENMAKERS, P. J.; VIVO-TRUYOLS, G.; DECROP, W. C. A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, p. 282-290, 2006

SCHUH, C.; SCHIEBERLE, P. 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**, v. 54, p. 916-924, 2006.

SHARMA, K.; BARI S. S.; SINGH; H. P. Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 253-258, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia- da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Editora UFSC, editora da UFRGS, Porto Alegre, 2004.

SOUZA, L. M.; IACOMIN, M; GORIN, P. A. J.; SARI, R. S.; HADDAD, M. A.; SASSAKI, G. L. Glyco- and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.145, p. 85-96, 2007.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SERRATO, R. V. ; COSTA D. E., IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1207, p.101–109, 2008.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 59-67, 2008.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SANT'ANA, C. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. Heart-cutting two-dimensional (size exclusion×reversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 99-105, 2009.

SPACIL, Z.; NOVAKOVA, L.; SOLICH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 76, p.189-199, 2008.

SPACIL, Z.; NOVAKOVA, L.; SOLICH, P. Comparison of positive and negative ion detection of tea catechins using tandem mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.123, p. 535–541, 2010.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219–243, 2004.

SPRONK, P. E.; ZANDSTRA, D. F.; INCE, C. Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation. **Critical Care**, v. 8, p. 462-468, 2004.

STOLL, D. R.; COHEN, J. D.; CARR, P. W. Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1122, p. 123-137, 2006.

TAKEO, T. Green tea and semi-fermented teas. Em : WILSON, K. C.; CLIFFORD, M. N. (eds.) **Tea cultivation to consumption**. London: Chapman and Hall, 1992. 413-414p.

TANAKA, N.; KIMURA, H.; TOKUDA, D.; HOSOYA, K.; IKEGAMI, T.; ISHIZUKA, N.; MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; SHINTANI, Y.; FURUNO, M.; CABRERA, K. Simple and comprehensive two-dimensional reversed-phase HPLC using monolithic silica columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 1273-1281, 2004.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 151-158, 2002.

VENKATRAMANI, C. J.; ZELECHNOOK, Y.; An automated orthogonal two-dimensional liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3484-3494, 2003.

VENKATRAMANI, C. J.; Patel, A. Towards a comprehensive 2D-LC-MS separation. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 510-518, 2006.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. **Food Chemistry**, v. 70, p. 337-344, 2000

WANG, Y. F.; WEI, X. L.; JIN, Z. Y. Structure analysis of an acidic polysaccharide isolated from green tea. **Natural Product Research**, v. 23, p. 678-687, 2009a.

WANG, Y. F.; WEI, X. L.; JIN, Z. Y. Structure analysis of a neutral polysaccharide isolated from green tea. **Food Research International**, v. 42, p. 739-745, 2009b.

WICKREMASINGHE, R. L. Tea. **Advances in Food Research**, v. 24, p. 229-286, 1978.

WOLFROM, M. L. THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methodology in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WRIGHT, A. J.; FISHWICK, M. J. Lipid degradation during manufacture of black tea. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1511-1513, 1979.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 269-276, 1994.

YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative Activities of Volatile Extracts from Green Tea, Oolong Tea, and Black Tea. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 7396-7401, 2003.

YANG, C. S.; LAMBERT, D. J.; JU, J.; LU, G.; SANG, S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 265-273, 2007.

YANG, L.; SHANSHAN F. U.; ZHU, X.; ZHANG, L.; YANG, Y.; YANG, X.; LIU, H. Hyperbranched Acidic Polysaccharide from Green Tea. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 3395-3405, 2010.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C., BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 219-231, 2005.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 4-19, 2007.

ZHAO, Y., CHEN, P., LIN, L., HARNLY, J. M., YU, L., LI, Z. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UHPLC/DAD/MS. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1269–1277, 2011.

ANEXO I

G Model
CHROMA 352722 1–9

ARTICLE IN PRESS

Journal of Chromatography A, xxx (2011) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



1 Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance
2 liquid chromatography assisted by liquid–liquid partition and two-dimensional
3 liquid chromatography (size exclusion_x reversed phase)

4 Q1 Camila T. Scoparo_A, Lauro M. de Souza_A, Nessana Dartora_A, Guilherme L. Sasaki_A, Philip A.J. Gorin_A,
5 Marcello Iacomini_A*

6 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

10 Received 8 August 2011

11 Received in revised form 17 October 2011

12 Accepted 20 November 2011

13 Available online xxx

Keywords:

15 *Camellia sinensis*

16 Green tea

17 Black tea

18 2D-LC

19 UHPLC

20 Mass spectrometry

ABSTRACT

Green and black teas (*Camellia sinensis*) contain compounds ranging from simple phenolics to complex glycosides, many of which have well-recognized health benefits. Here we describe two methodologies aiming to achieve a comprehensive analysis of hydro-alcoholic extracts of *C. sinensis*. In the first step, the extracts were partitioned in water, *n*-butanol, ethyl acetate and chloroform to separate the compounds according to their polarity, yielding less complex samples to be analyzed by ultra high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC–MS). Additionally, a comprehensive two dimensional liquid chromatography (2D-LC) technique, employing size exclusion chromatography (SEC)_x reversed phase (BEH-C18)_x was developed. The following compounds were identified on the basis of retention time, UV-spectra and MS fragmentation patterns: catechins, theaflavins and their gallate derivatives; kaempferol, quercetin and myricetin mono-, di-, tri- and tetraglycosides; esters of quinic acid and gallic or hydroxycinnamic acids; purine alkaloids, such as caffeine and theobromine; and many lipids. Additionally, there were many novel compounds that were previously undescribed, such as saponin isomers and gallic acid esters of four glycosides of myricetin, quercetin and kaempferol.

© 2011 Published by Elsevier B.V.