

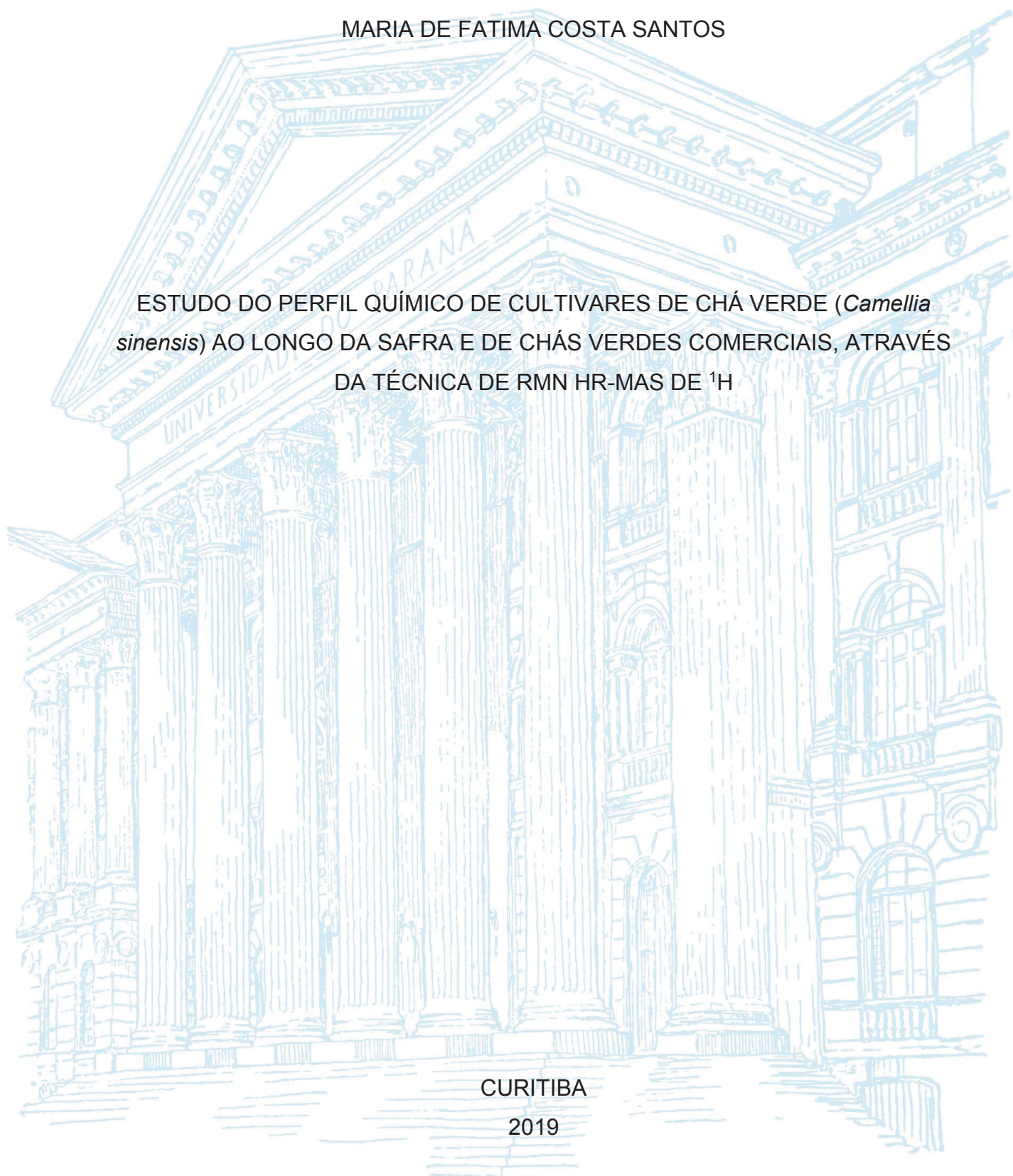
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA DE FATIMA COSTA SANTOS

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE CULTIVARES DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) AO LONGO DA SAFRA E DE CHÁS VERDES COMERCIAIS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN HR-MAS DE ^1H

CURITIBA

2019



MARIA DE FATIMA COSTA SANTOS

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE CULTIVARES DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) AO LONGO DA SAFRA E DE CHÁS VERDES COMERCIAIS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN ^1H

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Noemi Nagata e Prof^a. Dr^a. Maria Élide Alves Stefanello

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S237e Santos, Maria de Fatima Costa
Estudo do perfil químico de cultivares de chá verde (*Camellia sinensis*) ao longo da safra e de chás verdes comerciais, através da técnica de RMN HR-MAS de ¹H [recurso eletrônico] / Maria de Fatima Costa Santos – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Coorientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Noemi Nagata; Prof^ª Dr^ª. Maria Élide Alves Stefanello

1. Chá verde. 2. Chá – parâmetros climáticos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Barison, Andersson. III. Nagata, Noemi. IV. Stefanello, Maria Élide Alves. V. Título.

CDD: 633.72

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARIA DE FÁTIMA COSTA SANTOS** intitulada: **Estudo do perfil químico de cultivares de chá verde (*Camellia sinensis*) ao longo da safra e de chás verdes comerciais, através da técnica de RMN HR-MAS de ¹H**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Abril de 2019.

NOEMI NAGATA

Presidente da Banca Examinadora

CAROLINE DA ROS MONTÈS D'OCA

Avaliador Interno (UFPR)

POLIANA MACÊDO DOS SANTOS

Avaliador Externo (UTFPR)

GUILHERME LANZI SASSAKI

Avaliador Externo (UFPR)

DANIEL DA SILVEIRA RAMPON

Avaliador Interno (UFPR)

Dedicatória

Aos meus avós Alice Machado Costa e Wilson Costa *in memoriam* pelo amor, apoio incondicional e, principalmente pelo exemplo de vida.

Aos meus pais Maria de Lourdes Machado Costa e Agostinho dos Santos pelo amor, dedicação e incentivo ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) pela infraestrutura e suporte técnico para a realização desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Araucária, ao CNPq e FINEP pelo financiamento dos espectrômetros de RMN da infraestrutura utilizada nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison pela orientação, ensinamentos e oportunidades científicas que contribuíram para o aprimoramento do meu aprendizado e desenvolvimento desse trabalho.

Às Professoras coorientadoras Dra. Noemi Nagata e Dra. Maria Élide Alves Stefanello pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade, profissionalismo, bem como, contribuições significativas que colaboraram para o desenvolvimento e aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao Sr. Maurício Kitano, proprietário da empresa Agrochá Boa Vista e seus funcionários por gentilmente ter concedido a parceria, conhecimentos compartilhados e incentivo que permitiram a realização desse trabalho.

Aos Professores Dr. Guilherme Sasaki, Dr. Andersson Barison e Arquimedes Paixão de Santana Filho e David Santos pelo apoio técnico-científico e manutenção dos espectrômetros de RMN.

Aos membros da banca de avaliadores desse trabalho: Professores(as) Dr^a. Caroline da Ros Montes D'Oca, Dr. Daniel da Silveira Rampon, Dr. Fábio Simonelli, Dr. Guilherme Lanzi Sasaki e Dr^a. Poliana Macedo dos Santos pelas contribuições significativas para o aprimoramento desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Jaísa Fernandes Soares pela mediação do conhecimento, apoio e incentivo que contribuíram para o meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro e aos discentes da turma de FQO 1 pelos valiosos ensinamentos mediados durante o estágio à docência.

Ao Prof. Dr. Leandro Piovan pelo incentivo e mediação do conhecimento.

Aos Professores Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Dr. Cláudio Tormena, Dr. Luciano Lião e Dr. Elenilson Aves pela generosidade e contribuições científicas.

Aos amigos irmãos(as) do Centro de RMN: Alan Diego Santos, Caroline Quallio, Katlin Rech, Leice Novais Leociley Menezes, Lívia Dutra e Sher Ali pela

amizade, colaboração científica e ensinamentos que cada um ao seu modo me proporcionaram ao longo desses anos.

Aos amigos Grazieli da Rocha, Tiago José dos Santos, Adson Silva, Jeferson Yamashiro pela amizade, apoio e momentos vividos.

Às minhas amigas da Helga's House: Helga Polnow, Bianni Beeu, Lílian Lissner, Leice Novais, Paula Tieme, Bianca Peron, Letícia Fonseca, Maíra Mallman e Juliana Thomas pela amizade e momentos bem vividos nesse lar.

Aos amigos (as) Alberto Caixeta, Dheiver Santos, Martha Perez, João Albuquerque, Fernanda Ocampos, Tassya Matos, Luzia Lisboa, Yane Yonorato, Magali Amorim, Mara Dalmolin, Rodnei Eiselt, Laís Dill, Débora Kohepka, Eliz Cesca, Carla Gomes, Naiane Naidek, Rodolfo Rodrigues, Valmir da Silva, Gabriele Alves, Kahlile Kalil, Alexandre Kimura

Aos amigos(as) Charlene Anjos, Maria Telma Anjos, Rafaelly Nascimento, Paloma Prata, Bruno Araújo, Hugo César, Adriano Aquino, Romário Santos e Camilo Bruno pela amizade, apoio, generosidade, conversas construtivas e diversos momentos de descontração.

Aos meus pais Maria de Lourdes Machado Costa e Agostinho dos Santos pelo incentivo, apoio e dedicação dispendidos a mim e minha irmã. À minha irmã Jéssica Costa Santos pelo apoio, amizade, carinho e perseverança. Ao meu noivo Marcones Dantas pelo amor e apoio incondicional ao longo dessa jornada.

À minha tia Maria José Machado Costa pelo cuidado, carinho e incentivo ao longo de minha jornada. As minhas primas e cunhado, Ana Paula Machado, Paloma Machado Costa, Alberto Bezerra pelo incentivo, amizade e alegrias compartilhadas.

A amiga Eulina Santos pela amizade, carinho, generosidade e altruísmo, indispensáveis para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Deus por me fortalecer e iluminar a cada dia, toda a minha gratidão ao Senhor.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para desenvolvimento desse trabalho.

“O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita”.

(Guimarães Rosa)

RESUMO

O chá verde é um produto obtido do processamento das folhas frescas da espécie *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. É considerado a segunda bebida mais consumida depois da água. Os três principais marcadores de qualidade do chá verde são a teanina, as catequinas (EC, EGCG, EGC e ECG) e a cafeína. O seu consumo tem aumentado devido às suas propriedades biológicas, como antioxidante, neuroproteção, cardioproteção, entre outras. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia utilizando abordagens metabolômicas através da técnica de RMN HR-MAS de ^1H aliada à quimiometria, e investigar a influência dos parâmetros climáticos sobre a composição química do chá verde, visando contribuir para o controle de qualidade do produto. Desse modo, a composição química dos chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e 'Yutakamidori' foi investigada ao longo da safra através da RMN HR-MAS de ^1H quantitativa via ERETIC. Além disso, as amostras comerciais de chá verde foram avaliadas através do *fingerprinting* metabólico via RMN HR-MAS de ^1H . Os perfis metabólicos de ambas as cultivares mostraram-se similares qualitativamente. Através da PCA foi observado que as amostras de chá verde podem ser discriminadas ao longo da safra, e a variação da composição química pôde ser atribuída à influência dos parâmetros climáticos sobre a produção dos metabólitos. Para ambas as cultivares, os meses mais chuvosos apresentaram elevada concentração de ácido linolênico, o que está relacionado ao mecanismo de defesa da planta à infestação por fungos. A teanina apresentou elevadas concentrações no início dos meses chuvosos e com temperaturas baixas, e um decréscimo nos meses mais quentes. A *epi*-catequina apresentou um decréscimo da concentração sob alto índice de radiação solar e baixa precipitação, indicando susceptibilidade à excessiva taxa de irradiação UV-B. Entretanto, as concentrações da *epi*-catequina na cultivar 'Yabukita' foram superiores a 'Yutakamidori'. A cafeína apresentou elevada concentração no período pouco chuvoso a chuvoso, com temperaturas máximas intermediárias. Além disso, os chás verdes comerciais analisados apresentaram perfil espectral semelhante aos chás verdes autênticos, produzidos a partir das folhas de *C. sinensis*. Contudo, algumas marcas de chás apresentaram perfil espectral diferente do obtido a partir de amostras de *C. sinensis*, mas semelhante ao da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Dessa forma, o monitoramento da composição química do chá verde, atrelada aos parâmetros climáticos ao longo da safra, torna-se uma estratégia viável para o estabelecimento de padrões de qualidade do produto comercial. Assim como, a utilização do *fingerprinting* metabólico mostrou-se uma abordagem promissora para a identificação da espécie vegetal utilizada no preparo de chás.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*. Chá verde. RMN HR-MAS de ^1H . Parâmetros climáticos. ERETIC

ABSTRACT

Green tea is a product obtained from the processing of the fresh leaves of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. It is considered the most consumed drink second only to water. The three main quality markers of green tea are theanine, catechins (EC, EGCG, EGC, and ECG), and caffeine. Its consumption has increased due to its biological properties such as antioxidant, neuroprotection, cardioprotection, among other. The aim of this study was to develop a methodology using metabolomic approaches through the ^1H HR-MAS NMR technique, combined with chemometrics, and to investigate the influence of the climatic parameters on the chemical composition of green tea in order to contribute to the quality control of the product. Thus, the chemical composition of the green tea's cultivars 'Yabukita' and 'Yutakamidori' was investigated throughout the crop through quantitative ^1H HR-MAS NMR via ERETIC. In addition, commercial green tea samples were evaluated employing metabolic fingerprinting via ^1H HR-MAS NMR. The metabolic profiles of both cultivars were qualitatively similar. Through PCA was observed that green tea samples can be discriminated throughout the harvest, and the variation of the chemical composition could be attributed to the influence of the climatic parameters on the metabolites production. For both cultivars, the rainiest months presented a high concentration of linolenic acid, which is related to the plant defense mechanism to fungal infestation. Theanine showed high concentrations at the beginning of the rainy months and with low temperatures, and a decrease in the warmer months. *Epi*-catechin showed a decrease in concentration under high solar radiation index and low precipitation, indicating susceptibility to excessive UV-B irradiation rate. However, the *epi*-catechin content in 'Yabukita' was higher than 'Yutakamidori' cultivar. Caffeine presented high concentration in the bit rainy to rainy period, with maximum temperatures intermediate. In addition, the commercial green teas analyzed showed a spectral profile similar to the authentic green teas produced from the leaves of *C. sinensis*. However, some tea brands presented a different spectral profile than that obtained from samples of *C. sinensis*, but like that of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Thus, the chemical composition monitoring of green tea, linked to the climatic parameters throughout the harvest, becomes a viable strategy for the establishment of commercial product quality standards. As well as the use of metabolic fingerprinting was a promising approach for the identification of the plant species used in tea preparation.

Keywords: *Camellia sinensis*. Green tea. ^1H HR-MAS NMR. Climatic parameters. ERETIC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PLANTAÇÃO DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita', FOLHAS DOS BROTOS, FLORES E FRUTOS SITUADA EM GUAJUVIRA, ARAUCÁRIA-PR.	10
FIGURA 2 - PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE CHÁ VERDE.	12
FIGURA 3 - TIPOS DE PROCESSAMENTOS PARA A OBTENÇÃO DE CHÁS DE <i>C. sinensis</i> UTILIZANDO O MÉTODO ORTODOXO E O CTC.	16
FIGURA 4 - BIOSÍNTESE DA TEANINA	19
FIGURA 5 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.	21
FIGURA 6 – AS PRINCIPAIS SUBCLASSES DOS FLAVONÓIDES.	22
FIGURA 7 - ESTRUTURAS DAS CATEQUINAS COMUMENTE ENCONTRADAS NO CHÁ VERDE.	25
FIGURA 8 - ROTA BIOSINTÉTICA DA CAFEÍNA A PARTIR DA XANTOSINA.	27
FIGURA 9 - ESQUEMA DO PORTA-AMOSTRAS UTILIZADOS EM RMN EM SOLUÇÃO (TUBO DE RMN) E EM RMN HR-MAS (ROTOR). A – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO EXTRATO DO CHÁ VERDE E B - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ¹ H DO CHÁ VERDE DEMONSTRANDO QUE A RMN HR-MAS APRESENTA RESOLUÇÃO ESPECTRAL SEMELHANTE À RMN EM SOLUÇÃO.	29
FIGURA 10 - SEQUÊNCIAS DE PULSOS DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO.	35
FIGURA 11- BUCKETING DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H UTILIZANDO BUCKETS DE 0,08 PPM SOB A REGIÃO ESPECTRAL DE 9,00-0,50 PPM.	39
FIGURA 12 - METODOLOGIA UTILIZADA ABRANGENDO A OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS ATÉ A AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H. ...	49
FIGURA 13 - METODOLOGIA UTILIZADA PARA A AQUISIÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE RMN EM SOLUÇÃO.	49
FIGURA 14 - MÉTODOS TESTADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE MULTIVARIADA ATRAVÉS DO SOFTWARE AMIX®.	51
FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H (400 MHZ) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') UTILIZANDO A SEQUÊNCIA DE PULSOS (zgpr) EM DIFERENTES SOLVENTES DEUTERADOS.	54
FIGURA 16 - AMPLIAÇÃO DAS REGIÕES ENTRE δ 8,00-5,95 E δ 4,50-0,50 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H (400 MHZ) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') EM DIFERENTES SOLVENTES DEUTERADOS.	55

FIGURA 17 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO COM O SOLVENTE.....	56
FIGURA 18 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 3,40-2,60 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita')	56
FIGURA 19 - SEQUÊNCIAS DE PULSOS DE PRÉ-SATURAÇÃO AVALIADAS.....	58
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS DE PULSOS ZGPR E NOESYPR1D.....	59
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') ADQUIRIDOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE TRANSIENTES.....	60
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') ADQUIRIDOS COM VELOCIDADES VARIÁVEIS DE GIRO DO ROTOR.....	61
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') AVALIANDO O SHIMMING ATRAVÉS DO SINAL DO TMS (δ 0,00)	62
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS FOLHAS FRESCAS E DO CHÁ VERDE DE <i>C. sinensis</i> 'Yabukita'.	64
FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS FOLHAS FRESCAS E DO CHÁ VERDE DA <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'.....	64
FIGURA 26 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DURANTE OS MESES DA SAFRA DO CHÁ VERDE (OUT/2016 A ABRIL/2017) DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita'.....	65
FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DURANTE OS MESES DA SAFRA DO CHÁ VERDE (OUT/2016 A ABRIL/2017) DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'.....	66
FIGURA 28 - AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DA REGIÃO ENTRE δ 4.50-0,50 DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' AO LONGO DA SAFRA (OUT/2016 A ABRIL/2017).	68
FIGURA 29 - AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DA REGIÃO ENTRE δ 8,00-5,40 DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' AO LONGO DO PERÍODO DA SAFRA (OUT/2016 A ABRIL/2017).....	68
FIGURA 30 - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO CHÁ VERDE DAS CULTIVARES (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita e <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'). EM DESTAQUE	

OS SINAIS CARACTERÍSTICOS DESSES COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) REGIÃO ENTRE δ 5,45-0,90 PPM.	69
FIGURA 31 - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO CHÁ VERDE DAS CULTIVARES (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita e <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'). DESTAQUE OS PRINCIPAIS SINAIS CARACTERÍSTICOS DESSES COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) REGIÃO ENTRE δ 6,40 8,00 – 6,40 PPM.....	70
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') (600 MHz, CD_3OD).....	71
FIGURA 33 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD).....	72
FIGURA 34 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD).....	72
FIGURA 35 - ESTRUTURA DO ÁCIDO LINOLÊNICO.....	73
FIGURA 36 - ESTRUTURA DA TEANINA	75
FIGURA 37 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,15 – 0,93 DO ESPECTRO DE RMN EM SOLUÇÃO DE ^1H DO CHÁ VERDE (600 MHz, CD_3OD).....	76
FIGURA 38 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,15 - 0,95 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA HSQC (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE.....	76
FIGURA 39 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,15-0,95 DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA HMBC (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE.....	77
FIGURA 40 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 5,50-4,45 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita) (600 MHz, CD_3OD). (3) β -GLUCOSE (4) α -GLUCOSE, (5) SACAROSE.....	79
FIGURA 41 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD). (4) β -GLUCOSE, (5) α -GLUCOSE E (6) SACAROSE.....	79
FIGURA 42 - ESTRUTURA DA β -GLUCOSE.....	80
FIGURA 43 - ESTRUTURA DA α -GLUCOSE.....	80
FIGURA 44 - ESTRUTURA DA SACAROSE.....	81
FIGURA 45 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ_{H} 7,10-6,47 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') (600 MHz, CD_3OD).....	82
FIGURA 46 - ESTRUTURA DO (-)-GALATO DE EPI-GALOCATEQUINA (EGCG) (6).....	84
FIGURA 47 - ESTRUTURA DA (-)-EPI-GALOCATEQUINA.....	86

FIGURA 48 - ESTRUTURA DA (-)-GALATO DE EPI-CATEQUINA (ECG).	88
FIGURA 49 - ESTRUTURA DA (-)-EPI-CATEQUINA.	90
FIGURA 50 - ESTRUTURA DO ÁCIDO GÁLICO.....	92
FIGURA 51 - AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (¹ H- ¹³ C) HSQC DO CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') (¹ H: 600 MHz; ¹³ C: 150 MHz, CD ₃ OD). (7) (-)-GALATO DE EPI-GALOCATEQUINA (EGCG); (8) (-)-EPI-GALOCATEQUINA (EGC); (9) (-)-GALATO DE EPI-CATEQUINA (ECG); (10) (-) EPI-CATEQUINA (EC) E (11) ÁCIDO GÁLICO.....	92
FIGURA 52 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,20-5,80 DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (¹ H- ¹³ C) HMBC DO CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') (¹ H: 600 MHz; ¹³ C: 150 MHz, CD ₃ OD). (7) (-)-GALATO DE EPI-GALOCATEQUINA (EGCG); (8) (-)-EPI-GALOCATEQUINA (EGC); (9) (-)-GALATO DE EPI-CATEQUINA (ECG); (10) (-)-EPI-CATEQUINA (EC); (11) ÁCIDO GÁLICO.....	93
FIGURA 53 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE 1H DAS REGIÕES ENTRE δ 7,90-7,70 E δ 4,00-3,32 REFERENTE A CAFEÍNA NA AMOSTRA DE CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') (¹ H, 600 MHz, CD ₃ OD).....	94
FIGURA 54 - AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (¹ H- ¹³ C) HSQC DA AMOSTRA DE CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') PARA A CAFEÍNA (¹ H, 600 MHz; ¹³ C, 150 MHz, CD ₃ OD).....	95
FIGURA 55 - AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (¹ H- ¹³ C) HMBC DA AMOSTRA DE CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') PARA A CAFEÍNA (¹ H, 600 MHz; ¹³ C, 150 MHz, CD ₃ OD).....	96
FIGURA 56 - ESTRUTURA DA CAFEÍNA.	96
FIGURA 57 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA CAFEÍNA PADRÃO (400 MHz, CD ₃ OD).....	97
FIGURA 58 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C{ ¹ H} DE UM PADRÃO DE CAFEÍNA (100 MHz, CD ₃ OD).....	97
FIGURA 59 - EXPERIMENTO DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO DO CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') OBTIDO POR RMN HR-MAS DE ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) UTILIZANDO O INTERVALO DE TEMPO ENTRE OS PULSOS DE 0,01 s ATÉ 5,0s	98
FIGURA 60 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ¹ H QUANTITATIVO DO TIMOL (400 MHz, CD ₃ OD). ÁREA DO SINAL DE HIDROGÊNIO EM δ 6,96 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-3) UTILIZADA COMO SINAL DO ERETIC.	100
FIGURA 61 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ¹ H QUANTITATIVO DO CHÁ VERDE DE <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' (400 MHz, CD ₃ OD). OS SINAIS EM DESTAQUE SÃO REFERENTES AOS COMPOSTOS QUANTIFICADOS E O SINAL DO PADRÃO ERETIC EM -1,00 ppm.....	101

FIGURA 62 - INFLUENCE PLOT E HOTTELING T_2 DAS AMOSTRAS DE CHÁS VERDES DA CULTIVAR YBP EM FUNÇÃO DO PERÍODO DE SAFRA.	103
FIGURA 63 - GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC2 UTILIZANDO AS TRIPLICATAS DO CHÁ VERDE DA ESPÉCIE <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' DURANTE O PERÍODO DE SAFRA. GRÁFICO DE LOADINGS DE PC1 VERSUS PC2 EXPLICANDO A INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS NA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS APRESENTADAS NOS SCORES.	106
FIGURA 64 - INFLUENCE PLOT E HOTTELING T_2 DAS AMOSTRAS DE CHÁS VERDES DA CULTIVAR 'YUTAKAMIDORI' EM FUNÇÃO DO PERÍODO DE SAFRA.	107
FIGURA 65 - GRÁFICO DE SCORES DE PC1 X PC2 UTILIZANDO AS TRIPLICATAS DOS CHÁS VERDES DA ESPÉCIE <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori' DURANTE OS MESES DE PRODUÇÃO. GRÁFICO DE LOADINGS DE PC1 VERSUS PC2 EXPLICANDO A INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS NA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS APRESENTADAS NOS SCORES.	109
FIGURA 66 - AVALIAÇÃO MENSAL (OUTUBRO/2016 A ABRIL/2017) DOS METABÓLITOS PRESENTES NOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita' e <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori') (BOX PLOTS). LETRAS DIFERENTES MOSTRAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS MESES A 5% DE PROBABILIDADE DO TESTE DE TUKEY.	115
FIGURA 67 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE AMOSTRAS DE CHÁ VERDE COMERCIALIZADOS NO BRASIL (CV-2 A CV-30) EM COMPARAÇÃO AO CHÁ VERDE REFERENCIAL CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') (400 MHz, CD_3OD).....	117
FIGURA 68 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,20 – 0,70 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO AOS CHÁS COMERCIAIS CV-21 AO CV-30.	118
FIGURA 69 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,75-6,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO AOS CHÁS COMERCIAIS CV-21 AO CV-30.	119
FIGURA 70 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE REFERENCIAL CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO COM O CHÁ COMERCIAL (CV-24) E A ERVA-MATE (EM-1)	121
FIGURA 71 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,20 – 0,70 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita'). EM COMPARAÇÃO AO CHÁ COMERCIAL CV-24.	121
FIGURA 72 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 8,00-6,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE (CV-1) EM COMPARAÇÃO AO CHÁ COMERCIAL (CV-24) E A ERVA-MATE (EM-1).	122

FIGURA 73 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,40-3,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE CV-1 (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO AOS CHÁS COMERCIAIS CV-21 AO CV-30.	123
FIGURA 74 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,40-3,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE (CV-1, AMOSTRA DE CHÁ VERDE REFERÊNCIA), CHÁ COMERCIAL (CV-24) E A ERVA-MATE (EM-1)...	124
FIGURA 75 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE CV-24 (600 MHz, CD_3OD).	125
FIGURA 76 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.	125
FIGURA 77 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.	126
FIGURA 78 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,10 - 3,33 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.....	127
FIGURA 79 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,10-3,33 DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.	127
FIGURA 80 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,70-6,00 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO CHÁ CV-24 (600 MHz, CD_3OD).	128
FIGURA 81 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,70- 6,00 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24. ...	129
FIGURA 82 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,70- 6,00 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24. .	129
FIGURA 83 - ESTRUTURA DO ÁCIDO CAFEICO.	130
FIGURA 84 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS AMOSTRAS DE CHÁ VERDE (CV-1), ERVA-MATE (EM-1) E DA MISTURA DE CHÁ VERDE E ERVA-MATE.	132
FIGURA 85 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 3,10 – 0,50 DO ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS AMOSTRAS DE VERDE (CV-1), ERVA-MATE (EM-1) E DA MISTURA DE CHÁ VERDE E ERVA-MATE.....	132
FIGURA 86 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 8,10 – 5,17 DO ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS AMOSTRAS DE VERDE (CV-1), ERVA-MATE (EM-1) E DA MISTURA DE CHÁ VERDE E ERVA-MATE.....	133
FIGURA 87 – CROMATOGRAMA DO CG/MS DO TIMOL (TEMPO DE RETENÇÃO EM MIN).....	154
FIGURA 88 - ESPECTRO DE MASSAS DO TIMOL (m/z 150).	154

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - TEMPERATURAS MÁXIMA E MÍNIMA, MÉDIAS, E ÍNDICE DE RADIAÇÃO SOLAR DURANTE O PERÍODO DE SAFRA DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES *C. sinensis* 'Yabukita' E *C. sinensis* 'Yutakamidori'.....111
- GRÁFICO 2 - PRECIPITAÇÃO ACUMULADA E UMIDADE RELATIVA DO AR MÉDIA DURANTE O PERÍODO DE SAFRA DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES *C. sinensis* 'Yabukita' E *C. sinensis* 'Yutakamidori'.....111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - AMOSTRAS DE CHÁS VERDES COMERCIAIS ANALISADAS.....	44
TABELA 2. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA ÁCIDO LINOLÊNICO.....	74
TABELA 3. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA TEANINA.....	75
TABELA 4 - DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA β -GLUCOSE.....	80
TABELA 5 - DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA α-GLUCOSE.....	80
TABELA 6. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA SACAROSE.....	81
TABELA 7. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA (-)-GALATO DE <i>EPI</i> - GALOCATEQUINA.....	85
TABELA 8. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DO COMPOSTO (-)- <i>EPI</i> - GALOCATEQUINA.....	87
TABELA 9. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DA (-)-GALATO DE <i>EPI</i> -CATEQUINA. .	89
TABELA 10 - DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C DO COMPOSTO (-)- <i>EPI</i> -CATEQUINA	90
TABELA 11 - DADOS DE ¹ H E ¹³ C DO ÁCIDO GÁLICO.....	92
TABELA 12. DADOS DE RMN ¹ H E ¹³ C DA CAFEÍNA.....	96
TABELA 13 - IDENTIFICAÇÃO DOS SINAIS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES (<i>C.</i> <i>sinensis</i> 'Yabukita' E <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori') AO LONGO DA SAFRA.	99
TABELA 14. DADOS DE RMN ¹ H E ¹³ C DO ÁCIDO CAFEICO.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B₀	Campo magnético principal de um espectrômetro
δ_c	deslocamento químico para o núcleo de carbono
δ_H	deslocamento químico para o núcleo de hidrogênio
®	marca registrada
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
epi	epímero
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento em Hertz (Hz)
kHz	Quilohertz
m	Multiplete
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
S/R	Relação sinal/ruído
sl	Simpleto largo
t	Triplete
t_m	tempo de mistura (D8)
TMS	Tetrametilsilano
TMSP	Tetrametildeuteropropionato
AQ	<i>Acquisition Time</i> (Tempo de Aquisição)
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Correlação Homonuclear)
D1	<i>Delay</i> (Tempo de espera antes de cada aquisição)
DQD	<i>Digital Quadrature Detector</i> (Detecção Digital por Quadratura)
D8	<i>Mixing time</i> (Tempo de mistura)
JRES	<i>JResolved Spectroscopy</i>
FID	<i>Free induction decay</i> (Decaimento de indução livre)
LB	<i>Line Broadening</i> (Multiplicação exponencial aplicada no FID)

HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (Correlação Heteronuclear a Ligação Direta)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> (Correlação Heteronuclear a Longa Distância)
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> (Regressão Linear Múltipla)
PC	<i>Principal Components</i> (Componentes Principais)
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PCR	<i>Principal Component Regression</i> (Regressão por componentes Principais)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais)
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)
RD	<i>Recycle Delay</i> (tempo de espera entre os pulsos – D1)
SW	<i>Spectral width</i> (janela espectral)
TD	<i>Size of FID</i> (número de pontos utilizados para digitalização do FID)
TPPI	<i>Time-Proportional Phase Incrementation</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 <i>Camellia sinensis</i>	10
1.1.1 As cultivares de <i>C. sinensis</i>	12
1.1.2 Tipos de chás obtidos das folhas de <i>Camellia sinensis</i>	14
1.2.3 Composição química do chá verde e suas atividades biológicas	18
1.2.3.1 Aminoácidos	18
1.2.3.2 Flavonóides	20
1.2.3.2.1 Flavanóis	23
1.2.3.3 Alcaloides purínicos	26
1.3 A TÉCNICA DE RMN HR-MAS	27
1.3.1 Espectroscopia de RMN quantitativa (RMN _q) e suas aplicações	31
1.4 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	36
1.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	36
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 AMOSTRAS	43
3.1.1 Amostras de chá verde	43
3.1.2 Amostras comerciais de chá verde	43
3.1.3 Amostras comerciais de erva-mate	43
3.2 OTIMIZAÇÃO DA AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H 44	
3.2.2.2 Tempo de contato da amostra com o solvente	45
3.3 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO	45
3.3.1 Número de transientes	45
3.3.2 Velocidade de giro do rotor	46
3.3.3 Ajuste da homogeneidade do campo magnético (<i>Shimming</i>)	46
3.4 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H QUANTITATIVO DAS CULTIVARES DE CHÁ VERDE	46
3.4.1 Quantificação pelo método ERETIC	47
3.4.2 Análise estatística	48

3.5	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H QUALITATIVOS DOS CHÁS VERDES COMERCIAIS	48
3.6	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS EM SOLUÇÃO	49
3.7	ANÁLISE MULTIVARIADA DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H ..	51
3.8	PARÂMETROS CLIMÁTICOS.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H	53
4.1.2	Preparo de amostra	53
4.1.3	Avaliação do solvente.....	53
4.1.4	Avaliação do tempo de contato da amostra com o solvente	55
4.2	Aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H.....	57
4.2.1	Sequências de pulsos.....	57
4.2.2	Avaliação do número de transientes.....	59
4.2.3	Avaliação da velocidade de giro do rotor.....	60
4.2.4	Ajuste da homogeneidade do campo magnético (<i>Shimming</i>).....	62
4.3	PERFIL ESPECTRAL DAS FOLHAS FRESCAS E DO CHÁ VERDE DAS CULTIVARES (<i>C. sinensis</i> ‘Yabukita’ E <i>C. sinensis</i> ‘Yutakamidori’)	63
4.4	PERFIL METABÓLICO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES DE <i>C. sinensis</i> ‘Yabukita’ e <i>C. sinensis</i> ‘Yutakamidori’	65
4.5	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR RMN EM SOLUÇÃO	71
4.1.1	Identificação estrutural do ácido linolênico (1).....	73
4.1.2	Identificação estrutural da teanina (2).....	74
4.1.3	Identificação estrutural dos açúcares (4, 5 e 6)	78
4.1.4	Identificação estrutural dos flavanóis e do ácido gálico (6-10)	82
4.1.5	Identificação estrutural da (-)-galato de <i>epi</i> -galocatequina (EGCG) (6).....	83
4.1.6	Identificação estrutural da (-)- <i>epi</i> -galocatequina (EGC) (7)	86
4.1.7	Identificação estrutural da (-)- <i>epi</i> -catequina galato (ECG) (9)	88
4.1.8	Identificação estrutural da (-)- <i>epi</i> -catequina (EC) (10).....	90
4.1.9	Identificação estrutural da ácido gálico (11)	92
4.1.10	Identificação estrutural da cafeína (12).....	94

4.6	RMN HR-MAS de ¹ H QUANTITATIVO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' E <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'	98
4.7	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS CULTIVARES DE CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita')	102
4.8	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS CULTIVARES DE CHÁ VERDE (<i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori')	107
4.9	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS ABIÓTICOS SOB O PERFIL METABOLÔMICO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES <i>C. sinensis</i> 'Yabukita' E <i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'	110
4.10	ANÁLISE DO <i>FINGERPRINTING</i> METABÓLICO DOS CHÁS VERDES COMERCIAIS POR RMN HR-MAS DE ¹ H E RMN EM SOLUÇÃO	116
5.	CONCLUSÃO	134
6.	REFERÊNCIAS	136

1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos funcionais tem aumentado devido à busca da população por produtos que tragam benefícios à saúde e ocasionem uma melhor qualidade de vida. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005), alimento funcional é aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, produz efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos à saúde quando consumido como parte da dieta usual.

Dentre os alimentos com propriedades funcionais é possível citar os chás. O termo chá designa produtos constituídos de partes de vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão ou decocção em água potável (BRASIL, 2005). Além disso, o chá não pode apresentar em seu rótulo finalidade farmacoterapêutica (BRASIL, 2005).

Para assegurar a eficácia e a segurança alimentar de chás e fitoterápicos é necessário o controle de qualidade das plantas utilizadas como matéria-prima para o preparo desses produtos. O controle de qualidade é definido como um conjunto de critérios, responsáveis pelo estabelecimento de procedimentos, que garantam que, tanto a matéria-prima como o produto estejam de acordo com as especificações de qualidade consideradas satisfatórias (BRASIL, 2015).

No caso das espécies vegetais, o controle de qualidade consiste basicamente em três etapas: rastreabilidade, validação e análise fitoquímica. A rastreabilidade permite verificar a origem de cada suprimento na cadeia produtiva, identificando os riscos relacionados a contaminações e adulterações. A validação é o processo de caracterização do material vegetal ou extrato utilizado na produção. Finalmente, a análise química fornece a confirmação da composição química da espécie vegetal, além da detecção dos possíveis adulterantes (SIMMLER et al., 2018).

Torna-se importante salientar que os fatores bióticos, abióticos, cultivar, época de colheita, processamento e armazenamento podem ter influência significativa na composição química da matéria-prima vegetal, impactando na qualidade e no preço do produto (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Dentre esses fatores, os fatores abióticos como temperatura, radiação solar, pluviosidade e

umidade relativa do ar contribuem muito para a variação da composição química dos metabólitos secundários.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), estudos têm evidenciado que temperaturas mais elevadas favorecem a produção de compostos voláteis enquanto temperaturas mais baixas desfavorecem. Outro fator importante é a radiação solar que induz o aumento da produção de compostos fenólicos como flavonóides, taninos e antocianinas. Essa correlação está relacionada com a necessidade da planta se proteger da fotodestruição. Os compostos fenólicos absorvem e/ou dissipam a energia solar, diminuindo os danos causados pela radiação UV-B aos tecidos mais internos das folhas.

De maneira geral, o controle de qualidade das plantas é considerado um desafio devido à diversidade de seus metabólitos, e a possibilidade de variação das concentrações dos compostos em diferentes magnitudes (SIMMLER et al., 2018). Com o advento dos métodos analíticos modernos, os metabólitos puderam ser analisados sob a ótica da metabolômica. Esta pode ser definida como a área da ciência que se ocupa em analisar, qualitativamente e quantitativamente, o maior número de metabólitos de baixa massa molecular, presentes em células, órgãos e organismos (WOLFENDER et al., 2015). A abordagem metabolômica vem demonstrando sua potencialidade na área da fitoquímica através do emprego de duas metodologias: perfil metabólico e o *fingerprinting* metabólico.

O perfil metabólico consiste na análise de um amplo grupo de metabólitos que está relacionado a uma via metabólica específica, ou a uma classe de compostos (WOLFENDER et al., 2015). Por outro lado, o *fingerprinting* metabólico analisa o conjunto de metabólitos presentes no organismo, gerando um padrão específico para cada amostra, que pode ser considerado como uma “impressão digital” daquela matriz. O *fingerprinting* metabólico é considerado uma metodologia rápida, pois não há necessidade de identificar ou quantificar extensivamente os metabólitos em um determinado sistema biológico (WOLFENDER et al., 2015; SIMMLER et al., 2018).

A identificação e a quantificação de múltiplos metabólitos requerem a utilização de metodologias e técnicas que possuam velocidade na coleta de dados, reprodutibilidade e sensibilidade. Nesse contexto, duas técnicas analíticas vêm sendo aplicadas no estudo metabolômico de plantas: a cromatografia líquida (CL) acoplada a espectrometria de massas (EM) (LEE et al., 2019; NAPOLITANO

et al., 2014; NAVRATILOVA et al., 2019) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (LEE et al., 2015; NAPOLITANO et al., 2014; LEE et al., 2011). Dentre as técnicas mencionadas, a RMN tem se destacado no que se refere ao estado da matéria (em solução, semissólido e sólido), à reprodutibilidade, quantificação, e a capacidade de identificar metabólitos conhecidos e desconhecidos mesmo em misturas complexas (WOLFENDER et al., 2015; SIMMLER et al., 2017).

Nesse sentido, a técnica de ressonância magnética nuclear de alta resolução com giro no ângulo mágico (RMN HR-MAS) permite a análise de amostras semissólidas e tem sido uma técnica alternativa para o controle de qualidade de plantas. De maneira geral, a RMN HR-MAS tem sido utilizada em diversas etapas do controle de qualidade, por exemplo: na discriminação de espécies morfológicamente semelhantes do gênero *Cystoseira* e da espécie *Harconia speciosa* (JÉGOU et al., 2010; FLORES et al., 2018b); na avaliação da autenticidade das espécies de *Phyllanthus* (*P. amarus*, *P. caroliniensis*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. urinari*) (SANTOS et al., 2012), e na variação metabólica de quimiotipos de *Withania somnifera* (BHARTI et al., 2011).

Os trabalhos que envolvem a RMN e metabólica produzem um grande volume de dados, que algumas vezes requerem a aplicação da análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) é muito utilizada para auxiliar na compreensão dos dados obtidos. Essa técnica torna-se útil para extrair resultados que não podem ser obtidos apenas por inspeção visual dos espectros.

Dentre os chás, o chá verde é muito consumido mundialmente, e consiste em um produto obtido das folhas jovens da espécie *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (KELLOGG et al., 2017). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os polifenóis do chá verde podem ajudar a reduzir os riscos de diversas doenças como: cardiovasculares (FANG et al., 2019), cerebrais (KHALATBARY e KHADEMI, 2018), e alguns tipos de câncer (WANG et al., 2014; MIYATA et al., 2019.; CALGAROTTO et al., 2018).

Diante do exposto, esse trabalho teve a finalidade de empregar o perfil metabólico e o *fingerprinting* metabólico visando contribuir para o controle de qualidade e a autenticidade do chá verde por meio das técnicas de RMN HR-MAS associada com a quimiometria.

1.1 *Camellia sinensis*

A espécie *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze é um arbusto ou árvore pertencente à família Theaceae. Essa espécie é originária do sul da China e gradualmente foi sendo cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na Índia, Japão, Sudeste Asiático, África, América do Sul e Oceania (FAO, 2015). As principais características botânicas da espécie *C. sinensis* são a presença de folhas simples, alternas, inteiras, com margem serrada, textura coriácea, flores nas cores branca e amarela e frutos capsulares (LUNA; OCHOTERENA, 2004) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - PLANTAÇÃO DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita', FOLHAS DOS BROTOS, FLORES E FRUTOS SITUADA EM GUAJUVIRA, ARAUCÁRIA-PR.



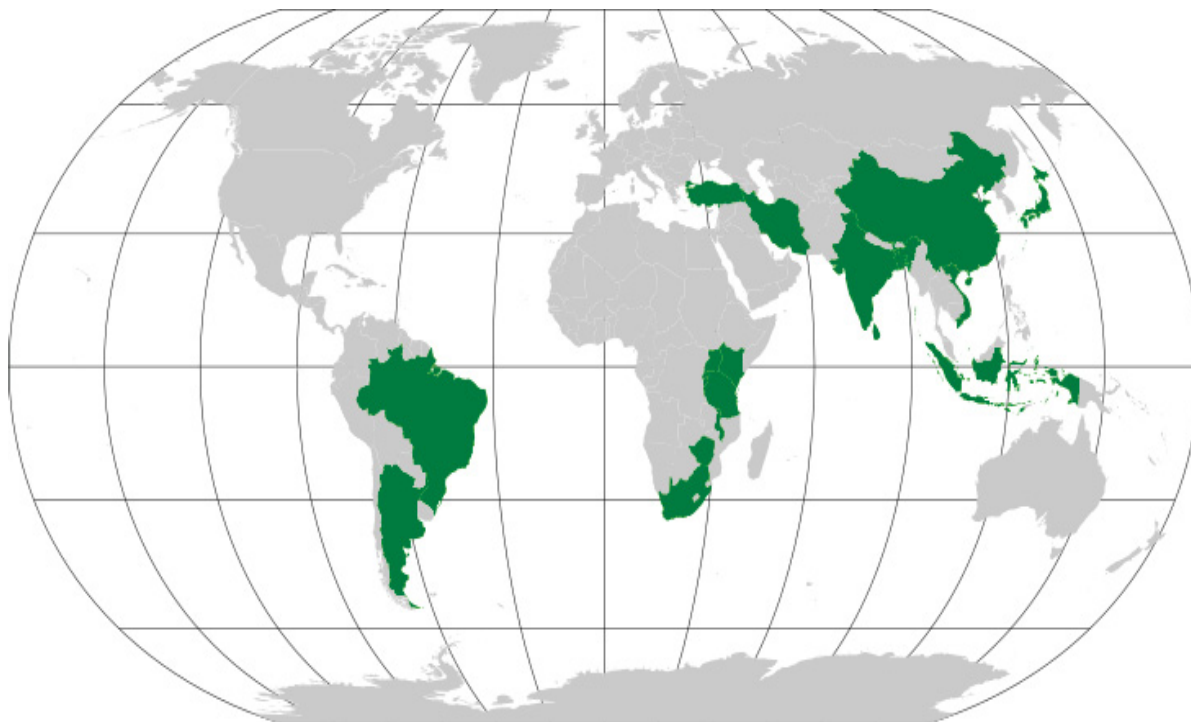
Fonte: O autor (2019).

A *C. sinensis* é conhecida como planta do chá, chá verde, chá preto e chá-da-índia, entre outros nomes populares, devido à esta espécie ter sido inicialmente utilizada para a manufatura do chá. A literatura reporta que a palavra “chá” se refere ao produto obtido da infusão ou decocção das folhas dos brotos de *C. sinensis* (ENGELHARDT, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 277, propõe a seguinte definição para o chá (BRASIL, 2005): “chá é um produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás.” Segundo a definição da ANVISA, o chá verde é um produto obtido das folhas frescas de *C. sinensis* (BRASIL, 2005). No presente trabalho, o termo “chá” corresponde ao comumente reportado na literatura, bem como, ao significado mais amplo empregado pela legislação brasileira.

O chá é considerado a segunda bebida não-alcóolica mais consumida no mundo depois da água. O aumento do consumo do chá é impulsionado pelo chá preto, seguido do chá verde (FAO, 2015). Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2015), em 2013 a China foi o maior produtor de chá verde, com 1,9 milhões de toneladas por ano, seguido da Índia com 1,2 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a décima oitava posição com uma produção de sete mil toneladas anuais em 2012 (FAO, 2015). Estima-se para o chá verde uma taxa de crescimento até 2027 de 7,5 % ao ano na produção mundial, com uma demanda estimada de 3,6 milhões de toneladas (FAO, 2018) (FIGURA 2, p. 12).

FIGURA 2 - PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE CHÁ VERDE.



FONTE: Adaptado de FAO, 2015.

1.1.1 As cultivares de *C. sinensis*

As principais variedades da espécie *C. sinensis* utilizadas para a produção do chá são a *C. sinensis* var. *sinensis* (tipo chinês) e *C. sinensis* var. *assamica* (tipo Assam = indiano) (MUKHOPADHYAY et al., 2015; DREW, 2019). Essas variedades possuem características distintas: a *C. sinensis* var. *sinensis* possui folhas pequenas, seu crescimento é lento e possui resistência a climas mais frios, enquanto que a *C. sinensis* var. *assamica* possui folhas grandes que crescem de forma mais rápida, sendo amplamente cultivada na Índia e em áreas tropicais (MUKHOPADHYAY et al., 2015).

Na prática agrícola mundial, a *C. sinensis* var. *sinensis* é cultivada em áreas de alta latitude, sendo destinada para a produção de chá verde, enquanto a *C. sinensis* var. *assamica* é empregada para a produção do chá preto (WEI et al., 2017). No Brasil, o cultivo de *C. sinensis* var. *assamica* é restrito ao Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo e a maior parte da safra é utilizada para a produção de chá preto (SAITO et al., 2007). Tipicamente, as plantações de *C.*

sinensis são mantidas como arbustos (60-90 cm), pois essa forma facilita a disponibilidade de novos brotos axilares com folhagem tenra, característica considerada ideal para o processamento do chá verde (MUKHOPADHYAY et al., 2015).

Com o crescimento da demanda pelo chá verde, foi iniciada a busca por plantas mais adaptadas ao frio e que produzissem um chá de melhor qualidade (WEI et al., 2017). Em consequência, surgiram as cultivares de *C. sinensis*. De acordo com o Código Internacional de Nomenclaturas de Plantas Cultivadas (ICNCP), cultivar é uma variedade cultivada que foi selecionada por uma ou mais características específicas que devem ser distintas, uniformes e estáveis após a sua propagação (TURLAND et al., 2018).

Os maiores cultivares de *C. sinensis* destinados à produção do chá verde foram selecionados no Japão. Os três cultivares japoneses de maior produtividade e aceitação no mercado mundial são *C. sinensis* 'Yabukita', *C. sinensis* 'Yutakamidori' e *C. sinensis* 'Asatsuyu' (TSUBAKI et al., 2013).

A cultivar *C. sinensis* 'Yabukita' foi desenvolvida por Hikosaburo Sugiyama em 1908. O nome Yabukita deriva das palavras japonesas "takeyabu" e "kita" que significam bambu e norte, ou seja, bambu do norte. Em 1953, a cultivar 'Yabukita' foi registrada e se difundiu entre os produtores de chá verde no Japão ocupando 75,4% do total da área cultivada destinada a produção do chá verde. (TSUBAKI et al., 2013).

As principais características da cultivar 'Yabukita' são a resistência a temperaturas mais baixas, alto rendimento e a produção do chá verde de alta qualidade com intenso sabor umami, quinto sabor que confere maior palatabilidade aos alimentos (TSUBAKI et al., 2013; UJIHARA et al., 2009). Contudo, apresenta como desvantagem a suscetibilidade às doenças fúngicas, como antracnose (*Colletotrichum* sp.) e a ferrugem cinzenta (*Pestalotiopsis* sp.) (YAGI; YEDA; SAITO, 2010). Além disso, a cultivar 'Yabukita' tem sido utilizada para a seleção de cultivares híbridos como a 'Okuhikari' e 'Okumidori' (YAGI; YEDA; SAITO, 2010).

A segunda cultivar amplamente empregada na produção do chá verde é a *C. sinensis* 'Yutakamidori'. Essa cultivar foi selecionada a partir de uma população de mudas da cultivar 'Asatsuyu' no Instituto Nacional da Ciência do Vegetal e do Chá em Kanaya (Japão) e registrada em 1966 (YAGI; YEDA; SAITO, 2010). A

cultivar 'Yutakamidori' apresenta considerável rendimento e é resistente a antracnose. Devido a essas características, 'Yutakamidori' é a segunda cultivar mais empregada no Japão ocupando 4,8 % da área cultivada para a produção do chá verde (YAGI; YEDA; SAITO, 2010; UJIHARA et al., 2009). A terceira cultivar *C. sinensis* 'Asatsuyu' foi registrada em 1953, ocupa uma área de cultivo menor, e possui reduzido rendimento (CHEN; CHEN; APOSTOLIDES, 2012).

No Brasil, as cultivares japonesas destinadas para a produção do chá verde são *C. sinensis* var. 'Yabukita', *C. sinensis* 'Yutakamidori' e *C. sinensis* 'Asatsuyu'. As principais regiões produtoras de chá verde que utilizam essas cultivares são os estados do Paraná e de São Paulo (região do vale do Ribeira), em que a colonização japonesa foi responsável pela expansão dessa prática agrícola. Cerca de 90% da produção de chá verde oriundo de *C. sinensis* 'Yabukita' é exportada para o Japão e os Estados Unidos da América, sendo o restante comercializado no Brasil.

1.1.2 Tipos de chás obtidos das folhas de *Camellia sinensis*

A partir das folhas jovens de *C. sinensis* podem ser produzidos diferentes tipos de chás. Estes chás são divididos em quatro categorias principais: verde e branco (não fermentado), oolong (semi-fermentado), preto (fermentado) e pu-erth (pós-fermentado) (DAGLIA et al., 2014) (FIGURA 3, p. 16).

De maneira geral, os chás de *C. sinensis* podem ser obtidos através de dois processos: tradicional (ortodoxo) e *Crush, tear and curl* (CTC). O método de CTC diferencia-se do tradicional apenas na etapa de rolagem no qual as folhas são transportadas para rolos cilíndricos que cortam, rasgam e enrolam as folhas (ENGELHARDT, 2013; DEB; POU., 2016). As demais etapas são características do processo tradicional.

De acordo com o tipo de chá a ser produzido, as folhas de *C. sinensis* podem ser submetidas à vaporização ou ao calor a seco, murchamento, rolagem, fermentação e secagem (FIGURA 3, p. 16) (ENGELHARDT, 2013; DAGLIA et al., 2014).

A vaporização ou tratamento com calor seco é uma etapa inicial aplicada apenas ao preparo dos chás verde e pu-erth. Esses dois processos consistem na

inativação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase e evitam que as folhas fiquem quebradiças. O processo de vaporização é peculiar do chá verde produzido através do método japonês, e o tratamento com calor seco é conhecido como método chinês (AHMED; STEEP, 2013). A principal diferença entre esses dois processos é a temperatura a que as folhas são submetidas. No processo de vaporização as folhas são cozidas sob o vapor de água a 100 °C, e no tratamento a seco, em geral a temperatura utilizada é 180 °C. De acordo com Ahmed e Steep (2013), a vaporização preserva a cor do chá verde e os compostos fenólicos mais do que o tratamento a calor seco (FIGURA 3, p. 16).

A etapa inicial do processamento dos chás branco, oolong e preto é o murchamento. Esse processo consiste na exposição das folhas ao sol ou a ambientes sob circulação de ar, para reduzir a umidade das folhas em 58-62%. A taxa de perda da umidade é determinante para um murchamento adequado. Durante o murchamento, as folhas túrgidas se tornam maleáveis, facilitando a etapa seguinte que é a rolagem (FIGURA 3, p. 16) (DEB; POU., 2013; LIANG et al., 2018; WANG et al., 2019).

A rolagem ou enrolamento das folhas é uma etapa comum aos chás verde, oolong, preto e pu-erth. No entanto, ocorre em etapas distintas do processamento. Para os chás verde e pu-erth, a rolagem ocorre após a vaporização ou tratamento com calor a seco. E para os chás preto e oolong, esse processo ocorre após o murchamento (AHMED; STEEP, 2013). A rolagem é utilizada para reduzir a umidade e moldar as folhas. Nesse processo, as folhas podem ser enroladas manualmente ou com auxílio de uma máquina de rolamento, o que é conhecido como método CTC, no qual as prensas giram em sentidos contrários sob circulação de ar quente. Nessa etapa, as folhas são moldadas em diversos formatos como agulhas, redonda e até mesmo são pulverizadas (AHMED; STEEP, 2013) (FIGURA 3, p. 16).

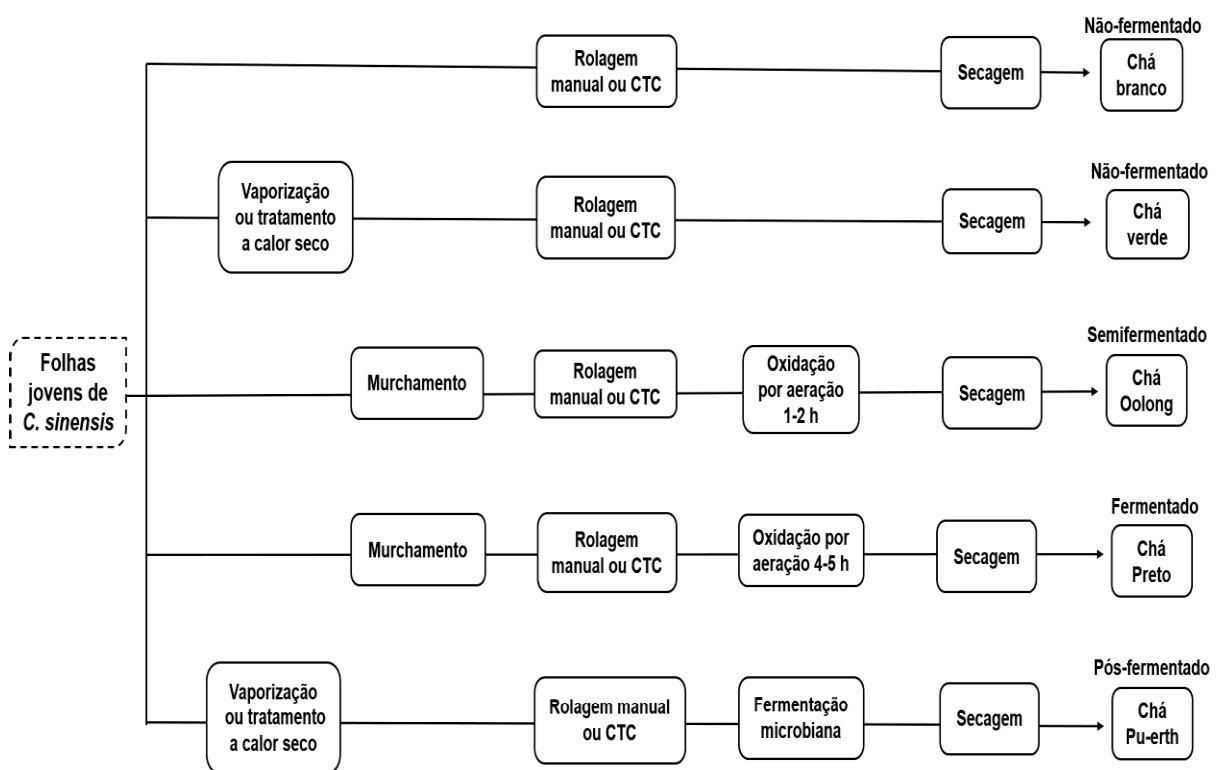
A etapa de oxidação é determinante para a produção dos chás preto e oolong. Esse processo inicia-se na rolagem das folhas. Após a ruptura das células das folhas, a seiva celular é exposta e os constituintes químicos em conjunto com as enzimas reagem na presença de oxigênio atmosférico. Em seguida, as folhas são expostas a baixas temperaturas e umidade durante cerca de 2 a 6 h. Nessas condições, as enzimas polifenoloxidase e peroxidase, na presença de oxigênio,

convertem as catequinas em compostos polifenólicos como as teaflavinas e as tearubiginas (AHMED; STEEP, 2013; DONG et al., 2018) (FIGURA 3, p. 16).

Além da oxidação, pode ser realizada uma etapa de fermentação antes do murchamento (FIGURA 3, p. 16). Comumente, os fungos do gênero *Aspergillus* spp, *Blastobotrys* spp e *Streptomyces* spp, bem como espécies de *Penicillium*, *Rhizopus* e *Saccharomyces* são utilizados na fermentação microbiana. A partir da fermentação microbiana é obtido o chá pu-erth (HOU; JENG; CHEN, 2010).

A etapa final comumente utilizada para os chás branco, verde, preto, oolong e pu-erth é a secagem por secadores mecânicos que reduzem o teor de umidade das folhas.

FIGURA 3 - TIPOS DE PROCESSAMENTOS PARA A OBTENÇÃO DE CHÁS DE *C. sinensis* UTILIZANDO O MÉTODO ORTODOXO E O CTC.



FONTE: Adaptado de Engelhardt, 2013.

Diante das diferentes etapas de processamento dos chás obtidos das folhas jovens de *C. sinensis*, serão abordadas as principais características dos chás branco, verde, preto, oolong e pu-erth.

Em comparação aos chás verde e preto, a obtenção do chá branco, não fermentado, é a mais simplificada. As folhas jovens são coletadas antes que as flores desabrochem. Em geral, a etapa de processamento consiste no murchamento prolongado em torno de 36 h, e em seguida as folhas, cortadas ou trituradas, são secas através de secadores mecânicos (ENGELHARDT, 2013; DAI et al., 2017).

No caso do chá verde, não fermentado, as folhas dos brotos são colhidas e, em seguida, dependendo do tipo de fábrica, são submetidas aos processos de vaporização ou tratamento com temperatura elevada (calor seco). Ambos os processos são responsáveis pela inativação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Após essa etapa, as folhas são submetidas à rolagem que ocorre sob aquecimento e, por fim, são secas em secadores mecânicos (ENGELHARDT, 2013). Esse processo resulta em uma maior concentração dos compostos da classe dos flavan-3-óis, tais como: *epi*-catequina, galato de *epi*-catequina, galato de *epi*-galocatequina, galato de galocatequina e galato de *epi*-galocatequina.

O chá preto, é um produto fermentado, obtido através de um processo de oxidação por aeração. Inicialmente, as folhas são coletadas e, em seguida são submetidas ao murchamento e a rolagem sem aquecimento. Na rolagem, inicia-se a oxidação catalisada pelas enzimas polifenoloxidase e peroxidase. Posteriormente, as folhas permanecem em local frio e úmido por um período de quatro a cinco horas e, em seguida são secas. O processo de fermentação confere ao chá preto um sabor característico, e a infusão deste apresenta uma tonalidade laranja-dourado. Essa tonalidade está relacionada com os compostos teaflavina e tearubiginas (ENGELHARDT, 2013; JOLVIS POU, 2016).

O processamento do chá oolong difere daquele do chá preto apenas na etapa de fermentação das folhas, que dura em torno de 1 a 2 horas (ENGELHARDT, 2013). O chá pu-erth é submetido ao mesmo processamento inicial do chá verde, no entanto, passa por uma etapa de fermentação microbiana antes da secagem. Nessa etapa, as folhas são mantidas em contato com microrganismos anaeróbicos e, por fim, são secas no secador mecânico (HOU; JENG; CHEN, 2010; ENGELHARDT, 2013).

No Brasil, há o predomínio das empresas que produzem o chá verde a partir das cultivares japonesas *C. sinensis* 'Yabukita', *C. sinensis* 'Yutakamidori', e *C. sinensis* 'Asatsuyu', por conferirem melhor qualidade ao produto. De acordo

com as condições climáticas, a safra pode ser iniciada em setembro ou outubro e ser finalizada em abril. A poda das folhas dos brotos é realizada durante 7 a 8 meses em um intervalo de 14 a 17 dias, o que resulta em 14 safras por ano.

O processamento utilizado para a obtenção do chá verde é o método japonês, cuja etapa inicial consiste na vaporização das folhas. Basicamente, o processamento ocorre em seis etapas, com uma duração de 4h 30 min: coleta das folhas dos brotos (período matutino), armazenamento das folhas em um sistema de ar, vaporização, rolagem e a secagem.

A coleta das folhas é realizada com auxílio de máquinas cortadeiras que cortam apenas as folhas dos brotos. Em seguida, essas folhas são armazenadas em um compartimento em que circula ar e reduz a umidade de maneira uniforme. Após isso, as folhas dos brotos são levadas até uma caldeira no qual são “cozidas” pelo vapor de água (vaporização). Nesta etapa, ocorre a inativação das enzimas polifenoloxidase e peroxidase que evita a oxidação das folhas. As folhas dos brotos cozidas são submetidas à rolagem sendo finamente trituradas. Por fim, as folhas dos brotos são secas em um secador mecânico, resultando no chá verde comercial.

1.2.3 Composição química do chá verde e suas atividades biológicas

1.2.3.1 Aminoácidos

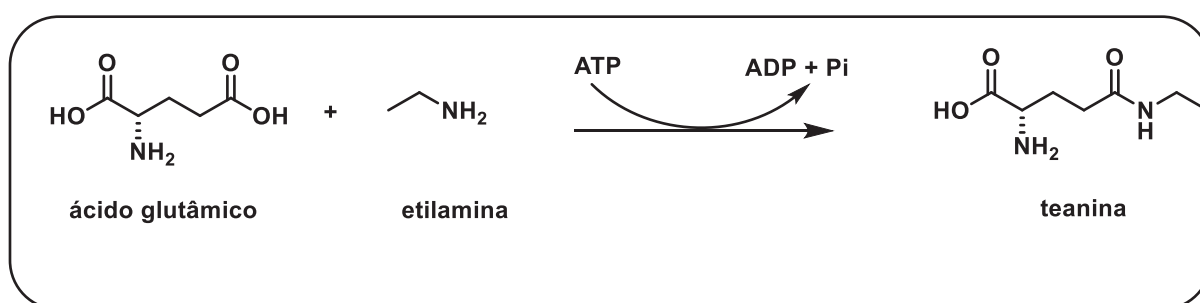
A composição química do chá verde é bastante diversificada. Dentre as classes de substâncias identificadas, têm-se os compostos fenólicos, terpenos, alcaloides e aminoácidos (ENGELHARDT, 2013).

O principal aminoácido do chá verde é a teanina (γ -glutamiletilamida), um aminoácido não-proteico encontrado na espécie *C. sinensis*, no cogumelo *Xerocomus badius* e, em outras espécies pertencentes ao gênero *Camellia* (*C. japonica*, *C. sasanqua*, *C. taliensis*, *C. assamica*, *C. furfuraceae* e *C. irrawadiensis*) (SAEED et al., 2017; DENG et al., 2010).

Assim como os demais aminoácidos, a teanina ocorre como o enantiômero S. A S-teanina é considerada um indicador de qualidade do chá por conferir um sabor característico, chamado umami. Portanto, a maior quantidade de teanina impacta na qualidade e no preço no chá verde (MU; ZHANG; JIANG., 2015).

Segundo DENG et al., 2010, a teanina pode ser encontrada nos cotilédones, brotos e nas raízes de *C. sinensis*. Em plantas maduras, a biossíntese ocorre nas raízes, é transferida através do floema para o caule e se acumula nas folhas em desenvolvimento. A biossíntese da teanina ocorre a partir do ácido glutâmico e da etilamina, em presença da enzima teanina sintase (FIGURA 4) (CHENG et al., 2017; ASHIRA, 2015).

FIGURA 4 - BIOSÍNTESE DA TEANINA



A concentração de teanina nas folhas de *C. sinensis*, depende de vários fatores, como variedade ou cultivar, área do cultivo, sazonalidade, e o tipo de processamento. (SAEED et al., 2017). Segundo Vuong, Bowyer e Roach (2011), o cultivo de *C. sinensis* em áreas sombreadas ou sob exposição reduzida à luz

direta do sol produz folhas com maiores teores de teanina e menores quantidades de catequinas. Além disso, os autores relataram que *C. sinensis* var. *sinensis* apresentou maiores concentrações de teanina em comparação com *C. sinensis* var. *assamica*.

Outro fator importante é a estação e o período de colheita. Os chás colhidos no início do verão possuíam elevados teores de teanina, o que pode explicar as diferenças significativas nos teores desse aminoácido entre chás da mesma espécie e local de cultivo. Em relação aos efeitos benéficos do chá verde, estudos têm demonstrado que a teanina promove a sensação de relaxamento e bem-estar mental (KIMURA et al., 2007; GILBERT, 2019); estimula a concentração e capacidade de aprendizagem (ZHU et al., 2018), bem como, apresenta atividade antitumoral (FRIEDMAN et al., 2009).

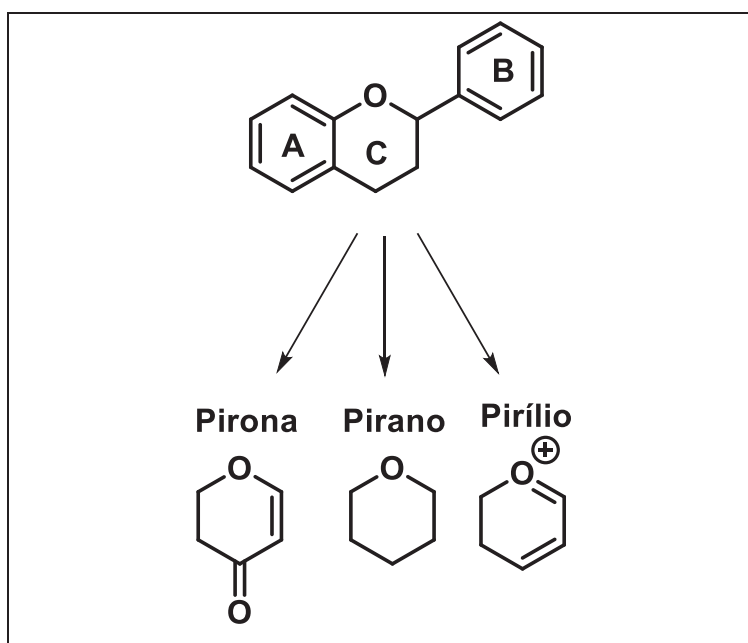
1.2.3.2 Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal que desempenham papéis essenciais para a sobrevivência das

plantas. De acordo com estudos de evolução química, as plantas evoluíram do ambiente aquático para o terrestre devido à capacidade de produzir flavonóides. Esses compostos são produzidos pelas plantas para que elas se protejam de ataques por fungos e outros patógenos, herbívoros, e, principalmente, da radiação ultravioleta (UV) (GOTTLIEB., 1982; DI FERDINANDO et al., 2012).

A estrutura básica dos flavonóides consiste em um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) contendo um oxigênio, que está ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B) (FIGURA 5). Contudo, as chalconas são uma classe de flavonóides de cadeia aberta que contém apenas os anéis A e B unidos por três carbonos. O anel heterocíclico (anel C) é formado a partir do ataque nucleofílico do tipo Michael da hidroxila fenólica à cetona α , β -insaturada da chalcona, o precursor dos flavonóides. Além disso, o anel C pode ser do tipo pirano, pirona e pirílio (DI FERDINANDO et al., 2012).

FIGURA 5 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.



Os flavonóides, de acordo com o grau de oxidação do anel C, podem ser divididos em várias subclasses. As principais são: flavonas, flavonóis, flavanóis, isoflavonas, antocianinas, flavanonois e chalconas (FIGURA 6, p. 22).

As flavonas apresentam uma ligação dupla entre as posições C-2 e C-3 e um grupo cetona na posição C-4 do anel C. Além disso, podem conter um grupo hidroxila na posição C-5 do anel A, bem como grupos hidroxilas na posição 7 do

anel A ou nas posições C-3 ' e C-4 ' do anel B. As isoflavonas se diferenciam das flavonas pela presença do anel B ligado ao C-3 do anel A (ZHANG; ZAO; QIO, 2013).

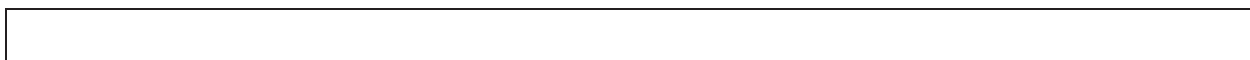
Em comparação com as flavonas, os flavonóis possuem um grupo hidroxila na posição C-3 do anel C, que também pode estar glicosilado. Os flavonóis podem apresentar uma diversidade de padrões de metilação e hidroxilação e de glicosilação (ZHANG; ZAO; QIO, 2013) (FIGURA 6, p. 22). Os flavanóis são também referidos como flavan-3-ol ou catequinas, uma vez que o grupo hidroxila está sempre ligado a posição C-3 do anel C. Ao contrário de muitos flavonóides, os flavanóis não apresentam a ligação dupla entre as posições C-2 e C-3 (FIGURA 6, p. 22). As isoflavonas se diferenciam dos flavonóis devido ao anel B estar ligado ao carbono na posição C-3 (SHARMA; RAMAWAR, 2013; OLIVEIRA; MATEUS; FREITAS, 2013).

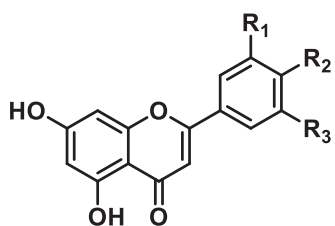
As flavanonas são denominadas também de diidroflavonas. A principal característica das flavanonas é a que o anel C é saturado, o que leva a presença de um estereocentro na posição C-2 (NINOMIYA; KOKETSU, 2013).

A antocianina, também conhecida como íon flavílio, apresenta uma carga positiva no átomo de oxigênio do anel C da estrutura básica dos flavonóides (FIGURA 6, p. 22). Nas plantas, as antocianinas são responsáveis pelas cores atraentes das flores, frutos (especialmente bagas) e sementes (DE PASCUAL-TEREZA; SANCHEZ-BALLESTA, 2013).

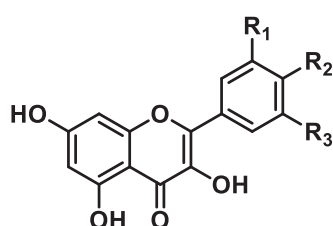
Dentre os metabólitos secundários da classe dos flavonóides, as chalconas e as flavanonas são as menores subclasses. As chalconas são flavonóides de cadeia aberta em que dois anéis aromáticos (A e B) são unidos por um sistema carbonílico α - β -insaturado contendo três carbonos (FIGURA 6, p. 22). Embora o esqueleto da chalcona seja a estrutura precursora na biossíntese dos flavonóides, a sua ocorrência é rara no reino vegetal (NINOMIY; KOKETSU, 2013) (FIGURA 6, p. 22).

FIGURA 6 – AS PRINCIPAIS SUBCLASSES DOS FLAVONÓIDES.

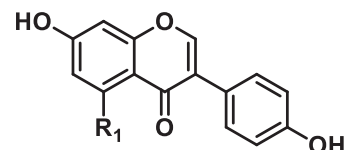


Flavona

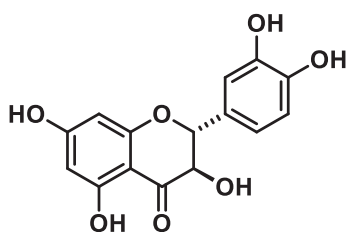
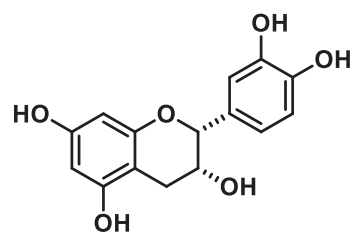
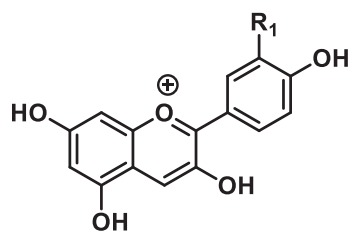
Luteolina: $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$
Apigenina: $R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$
Crisina: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

Flavonol

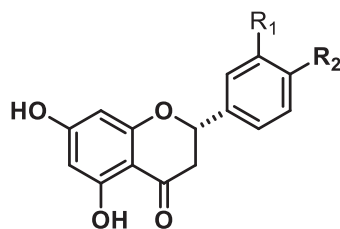
Quercetina: $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$
Canferol: $R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$
Galangina: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

Isoflavona

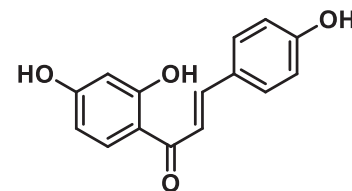
Genisteína: $R_1 = \text{OH}$
Daidzeína: $R_1 = \text{H}$

Flavanonol**Taxifolina****Flavanol****(-)-epi-catequina****Antocianina**

Cianidina: $R_1 = \text{OH}$
Pelargonidina: $R_1 = \text{H}$

Flavanona

Hesperetina: $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$
Naringenina: $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$

Chalcona**Isoliquiritigenina**

1.2.3.2.1 Flavanóis

Dentre as subclasses dos flavonóides, destacam-se os flavan-3-óis ou catequinas. A estrutura básica dos flavanóis apresenta duas hidroxilas nas posições C-5 e C-7 no anel aromático A, duas hidroxilas nas posições C-3' e C-4' do anel B, também conhecido como grupo catecol, e uma hidroxila na posição C-3 do anel C (OLIVEIRA; MATEUS; FREITAS, 2013) (FIGURA 7, p. 25).

Além disso, a incorporação de um grupo hidroxila na posição C-5' do anel B fornece uma estrutura fenólica com três hidroxilas vizinhas, conhecida como pirogalol, e que estão presentes nas galocatequinas. Os flavanóis podem também apresentar uma unidade galoila ligada à hidroxila do anel C, sendo então denominados de galatos (ésteres derivados do ácido gálico).

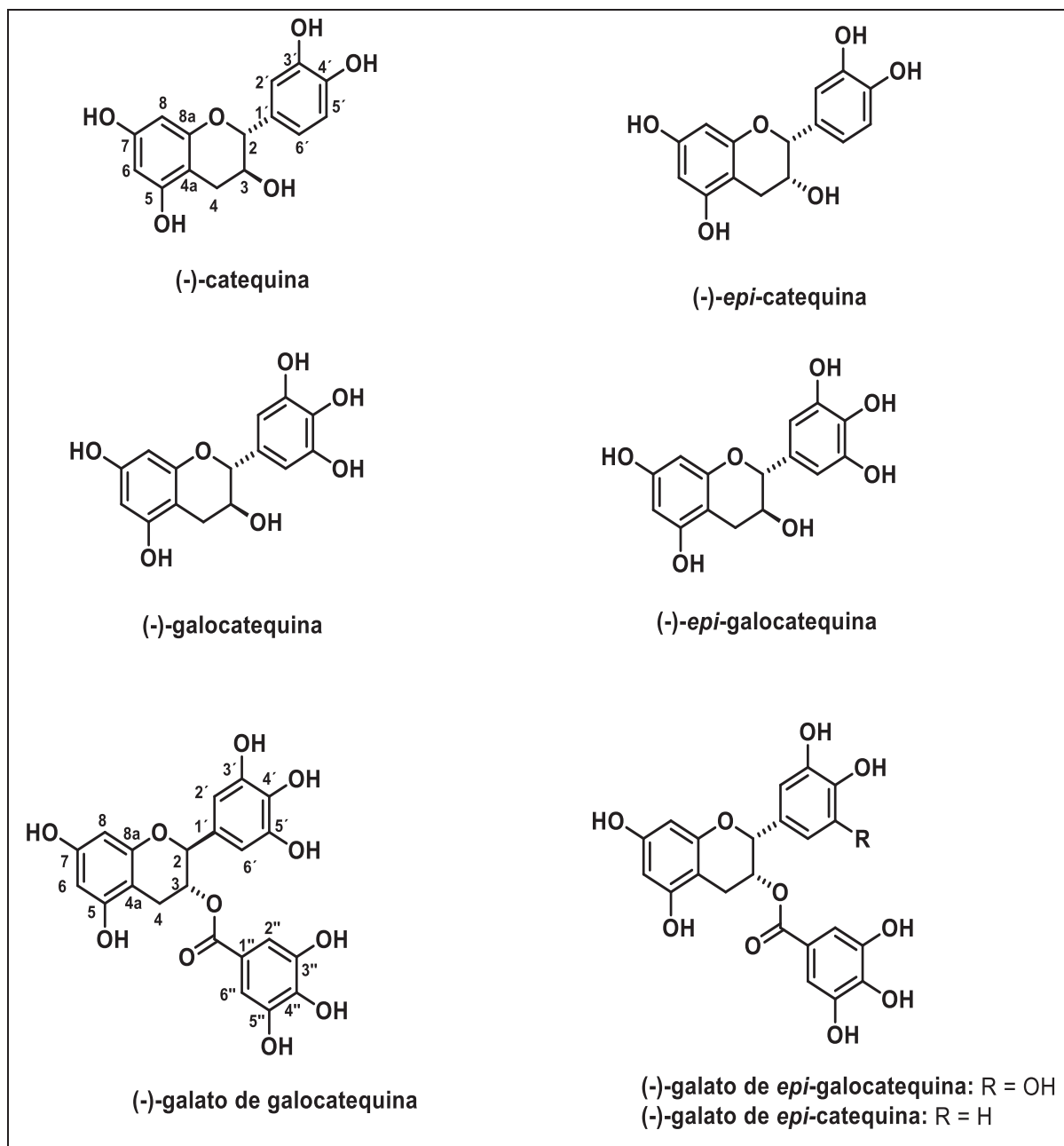
É importante ressaltar que a presença de uma hidroxila na posição C-3, bem como a ausência da ligação dupla no anel C, resulta em dois estereocentros em C-2 e C-3 (FIGURA 7, p. 25). Com isso, os flavanóis se diferem uns dos outros na estereoquímica dos estereocentros (C-2 e C-3) do anel pirano C e no padrão de hidroxilação de anéis A e B. Os flavanóis mais comuns no reino vegetal são hidroxilados nos carbonos C-5 e C-7 no anel A, diferindo apenas no padrão de hidroxilação do anel B e na estereoquímica do carbono C-3 do anel C. Nos flavonóis naturais, o carbono C-2 ocorre quase exclusivamente com a configuração *2R*.

Outra característica dos flavanóis é que quando o anel B está orto-diidroxilado, duas situações podem ser observadas: os carbonos C-2 e C-3 apresentam uma configuração absoluta *2R*, *3S* (configuração *trans*) como em (+)-catequina ou apresenta uma configuração *2R*, *3R* (configuração *cis*) como em (-)-*epi*-catequina.

Os flavanóis podem se apresentar como epímeros, que são diastereoisômeros que possuem a configuração oposta de somente um de dois ou mais centros estereogênicos presentes na molécula (IUPAC, 2019). Assim, os flavanóis com uma configuração absoluta *3R* no carbono C-3 apresentam o prefixo *epi*. Além disso, o anel B monoidroxilado e triidroxilado origina a (+)-galocatequina ou (-)-*epi*-galocatequina, respectivamente. Além disso, os flavonóis também podem ser esterificados com o ácido gálico no grupo hidroxila do carbono C-3, que origina o galato de *epi*-galocatequina (OLIVEIRA; MATEUS; FREITAS, 2013).

Os flavanóis comumente encontrados no chá verde são a catequina, galocatequina, *epi*-catequina, *epi*-galocatequina, galato de galocatequina e galato de *epi*-galocatequina galato (DEWICK, 2009) (FIGURA 7, p. 25).

FIGURA 7 - ESTRUTURAS DAS CATEQUINAS COMUMENTE ENCONTRADAS NO CHÁ VERDE.



Diversos estudos têm evidenciado as atividades biológicas do chá verde (infusão), extrato de chá verde e de suas catequinas isoladas. De acordo com Martins et al. (2017), as propriedades medicinais do chá verde estão relacionadas principalmente às catequinas presentes.

Estes compostos forneceram proteção contra o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas em modelos animais. A catequina considerada mais importante do chá verde é o galato de *epi*-galocatequina (EGCG) que normalmente compreende 60-65% do total das catequinas. A galato de *epi*-galocatequina tem sido reportado como agente antioxidante (CAO et al., 2018); anticancerígeno (MIN et al., 2014; EISENTEIN, 2019); antiviral (CARNEIRO et al., 2016) e bactericida (LAGHA et al., 2017), entre outras atividades.

1.2.3.3 Alcaloides purínicos

De maneira geral, os alcaloides são um grupo de compostos químicos que ocorrem naturalmente em algumas plantas e animais que contém um ou mais átomos de nitrogênio (DEWICK, 2009). Contudo, do ponto de vista estrutural, os alcaloides são geralmente classificados de acordo com seu precursor em: alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides (DEWICK, 2009).

Os alcaloides verdadeiros são derivados de aminoácido e compartilham um anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio, por exemplo, a papaverina. Os protoalcaloides são compostos em que o átomo de nitrogênio pode ser derivado de aminoácido, mas não faz parte do anel heterocíclico como a mescalina. E, os pseudoalcaloides possuem um esqueleto básico que não é derivado dos aminoácidos. Eles podem resultar das reações de aminação e transaminação, por exemplo, a cafeína e a efedrina (DEWICK, 2009).

Dentre os pseudoalcaloides, os alcaloides purínicos estão distribuídos amplamente no reino vegetal. Esses compostos orgânicos são classificados como compostos aromáticos heterocíclicos que contêm um anel pirimidínico fundido ao anel imidazólico. Os alcaloides purínicos são conhecidos também como xantinas ou metilxantinas (FIGURA 8, p. 27) (DEWICK, 2009; OESTREICH-JANZEN, 2016).

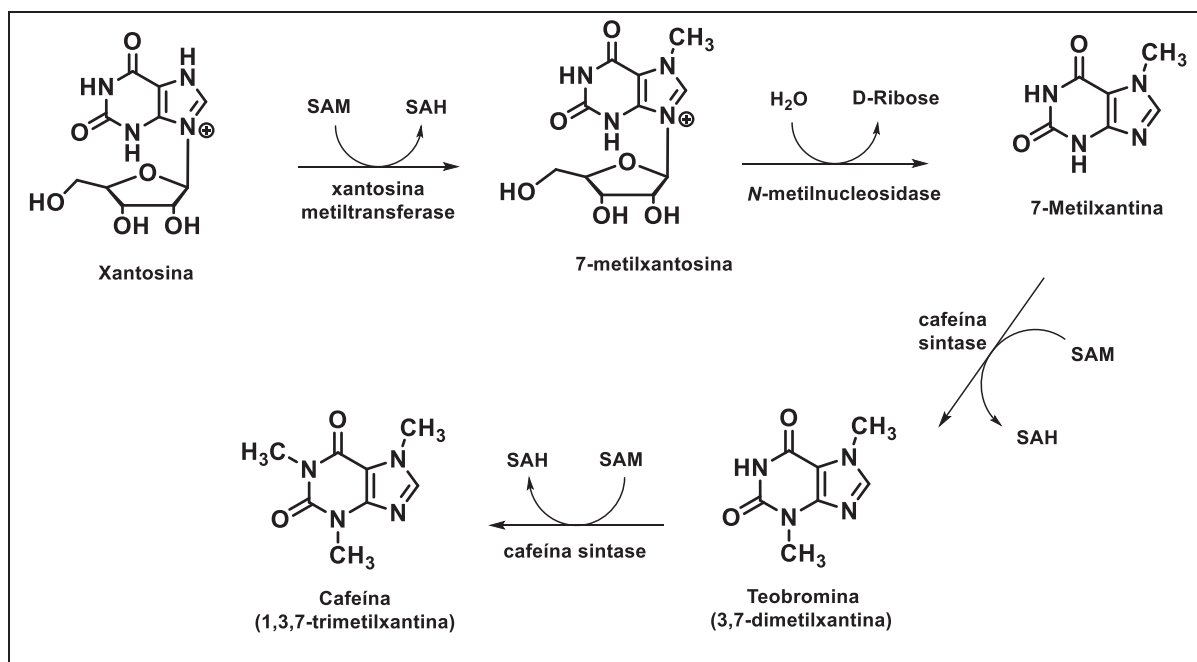
O principal alcaloide purínico encontrado na espécie *C. sinensis* é a cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Além disso, podem ser encontradas, em menor proporção,

a teobromina (3,7-dimetilxantina), e a teofilina (1,3-dimetilxantina). As espécies *Camellia ptilophylla* e *C. irrawadiensis* acumulam mais teobromina que cafeína (FIGURA 8, p. 27).

A cafeína é parte da composição química das espécies *Coffea ararabica*, *Paulinia cupania*, *Ilex paraguariensis*, e *Theobroma cacao* que produzem o café, o guaraná, a erva-mate e o chocolate, respectivamente (ASHIHARA, CRATO; CROZIER, 2010). O consumo de cafeína pode resultar em efeitos positivos para a saúde, incluindo a prevenção da *diabetes mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, e doença de Parkinson (GASPAR; RAMOS, 2016).

A principal via biossintética da cafeína consiste em uma sequência de quatro etapas (FIGURA 8, p. 27). A etapa inicial consiste na conversão da xantósina em 7-metilxantósina através da enzima xantósina metiltransferase. Na segunda etapa ocorre a hidrólise da 7-metilxantina pela *N*-metilnucleosidase, seguida da metilação da 7-metilxantina, obtendo-se a teobromina pela ação da enzima cafeína sintase. Finalmente, na quarta etapa ocorre a metilação da teobromina, mediada pela cafeína sintase, formando a cafeína.

FIGURA 8 - ROTA BIOSSINTÉTICA DA CAFEÍNA A PARTIR DA XANTOSINA.



FONTE: Adaptado de ASHIHARA; KATO; CROZIER, 2010.

1.3 A TÉCNICA DE RMN HR-MAS

A análise de sistemas semissólidos como tecidos intactos, animal e vegetal, é caracterizada por fortes interações anisotrópicas que produzem baixa resolução espectral devido ao alargamento dos sinais. A fim de resolver esses inconvenientes foi desenvolvida em 1996, a técnica conhecida como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS: *High Resolution Magic Angle Spinning*). A RMN HR-MAS permite a análise de amostras heterogêneas ou semissólidas (tipo gel) em seu estado natural, com resolução espectral comparável àquela da RMN em solução (KEIFER et al., 1996; MUCCI et al., 2013).

As amostras semissólidas têm como característica a não-homogeneidade e o movimento molecular restrito. Nessa condição, as interações de origem magnética e eletrônica, como o acoplamento dipolar, a diferença de susceptibilidade magnética e o deslocamento químico anisotrópico, passam a ser pronunciadas nessas amostras. Os campos magnéticos gerados por diferentes pacotes de *spins* interagem e resultam em um acoplamento dipolar diferente de zero. Além disso, a diferença de susceptibilidade magnética média varia espacialmente na amostra, levando a uma magnetização não uniforme das moléculas em relação ao campo magnético principal (B_0). Esses efeitos são responsáveis pelo alargamento do sinal de centenas a milhares de Hertz (BECKONERT et al., 2010; SANTOS et al., 2015).

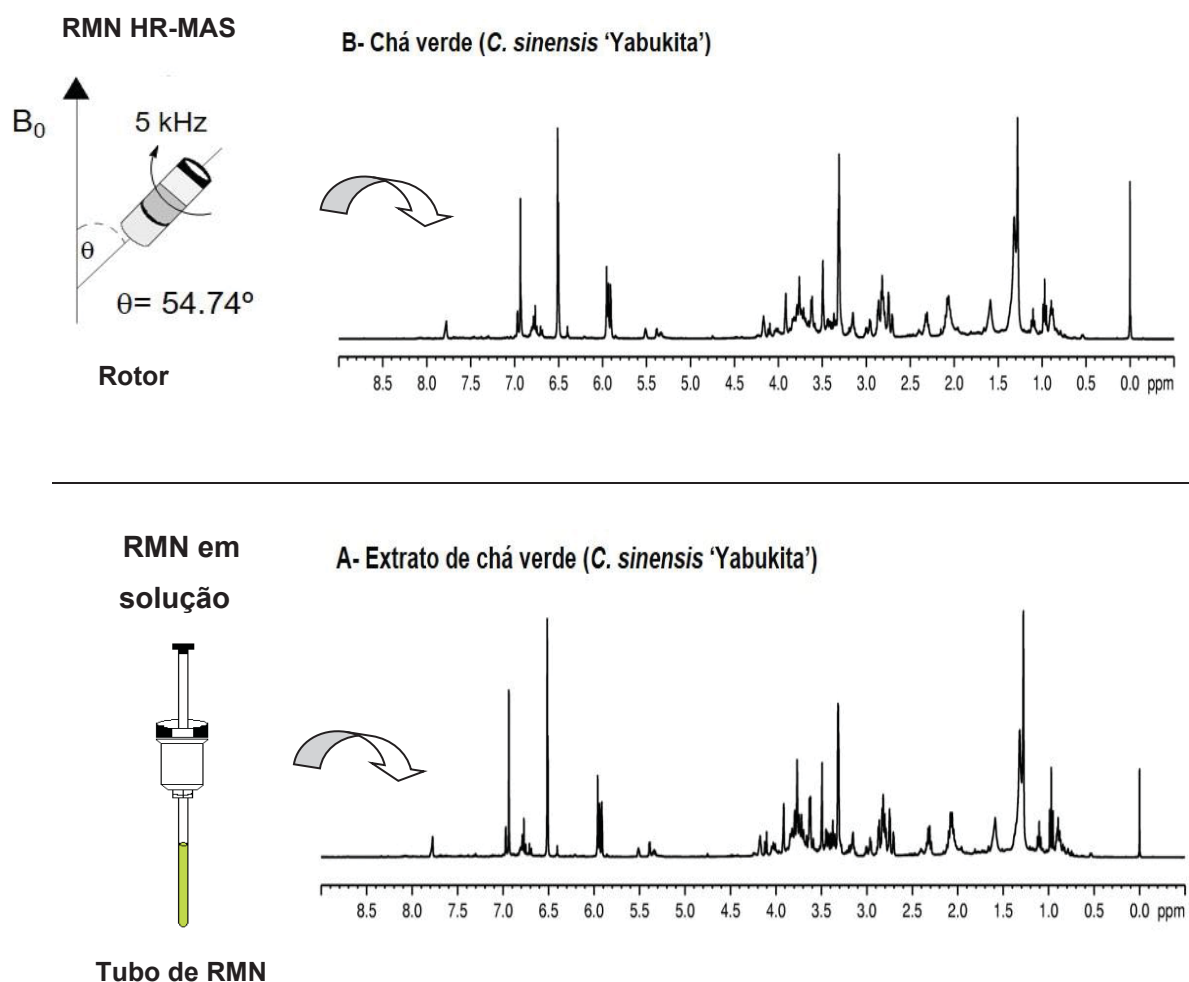
Os efeitos de acoplamentos dipolares e o deslocamento químico anisotrópico contribuem para o alargamento das linhas de ressonâncias devido às diferenças entre os campos magnéticos locais que os pacotes de *spins* experimentam. A relação entre os campos magnéticos locais (B_{loc}) e os momentos magnéticos de *spins* é dada segundo a equação:

$$B_{loc} = \pm \mu_S r_{IS}^{-3} (3\cos^2\theta_{IS} - 1) \quad (1)$$

em que B_{loc} corresponde ao campo magnético experimentado por um núcleo I; μ_S equivale ao momento magnético do núcleo S; r_{IS} é a distância intermolecular entre os núcleos; θ é o ângulo entre o vetor internuclear (responsável por essas interações) e o campo magnético principal (B_0) (CHEN e SINGER et al., 2007; BECKONERT et al., 2010).

Ao submeter a amostra ao giro a velocidades superiores a magnitude do acoplamento dipolar, em torno do ângulo mágico ($\theta = 54,74^\circ$), o termo $3 \cos^2 \theta - 1$ é promediado a zero, resultando em uma diminuição acentuada do alargamento da linha. Dessa forma, o espectro de RMN HR-MAS é obtido com uma resolução espectral semelhante à RMN em solução (FIGURA 9) (FAROOQ et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

FIGURA 9 - ESQUEMA DO PORTA-AMOSTRAS UTILIZADOS EM RMN EM SOLUÇÃO (TUBO DE RMN) E EM RMN HR-MAS (ROTOR). A – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO EXTRATO DO CHÁ VERDE E B - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE DEMONSTRANDO QUE A RMN HR-MAS APRESENTA RESOLUÇÃO ESPECTRAL SEMELHANTE À RMN EM SOLUÇÃO.



Para o preparo de amostras semissólidas analisadas por RMN HR-MAS utiliza-se um rotor que varia de 12 a 50 μL . O rotor, ou porta-amostra, tem o

formato semiesférico, o que contribui para uma melhor compactação da amostra e, redução das diferenças de suscetibilidade magnética (BECKONERT et al., 2010).

A amostra é inserida no rotor com o solvente deuterado e, em geral, pode ser escolhida a velocidade de giro entre 4 a 6 kHz. A velocidade de giro é escolhida de acordo com a amostra e o campo magnético. As amostras biológicas devem ser submetidas a velocidades de giro baixas a moderadas, para evitar o rompimento da estrutura celular causada pela força centrífuga a qual o rotor está sujeito (RENAULT et al., 2013). A escolha do solvente deuterado deve ser realizada de acordo com a composição química da matriz analisada (FAROOQ et al., 2013). Além disso, a técnica de RMN HR-MAS utiliza sondas com gradiente de campo pulsado que permite a realização de experimentos de RMN homo e heteronucleares (BECKONERT et al., 2010).

A RMN HR-MAS tem sido explorada em diversas investigações, principalmente no que concerne ao controle de qualidade de plantas e alimentos (SANTOS et al., 2015; FLORES et al., 2019). Essa técnica tem sido bastante versátil, pois a partir de uma pequena quantidade de amostra e solvente deuterado, e o mínimo ou nenhum preparo de amostra, pode-se investigar e monitorar as mudanças metabólicas frente aos fatores ambientais e genéticos, bem como, discriminar plantas botânica e geograficamente (SANTOS et al., 2015; DEBORDE et al., 2017). Devido a sua versatilidade, a técnica de RMN HR-MAS tem sido empregada na investigação da composição química de tecidos vegetais inteiros, como brotos, flores, frutos e raízes de plantas (FLORES et al., 2019).

Nesse contexto, a RMN HR-MAS tem sido utilizada nas investigações do perfil metabólico das plantas e dos alimentos por permitir a identificação da composição química diretamente dos tecidos vegetais utilizando o mínimo preparo de amostra. Essa ferramenta tem contribuído para o monitoramento da resposta das plantas aos fatores bióticos e abióticos que são considerados relevantes para o controle de qualidade das plantas (AUGUSTJIN et., 2016; SILVA et al., 2012; FUMAGALLI et al. 2009; CHOZE et al., 2012).

Augustjin et al. (2016) analisaram o perfil metabólico das folhas de variedade selvagem e mutante de *Arabidopsis thaliana* ao longo do ciclo circadiano por RMN HR-MAS de ^1H associado à quimiometria. Segundo os autores, a análise das folhas intactas de *A. thaliana* permitiu o estudo do

metabolismo da planta durante o ciclo claro/escuro, e a PCA dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das folhas de *A. thaliana* demonstrou que os metabólitos primários variaram significativamente em diferentes momentos do ciclo circadiano.

Similarmente, Silva et al. (2012) investigaram o mecanismo de resposta das folhas e cascas dos frutos de *Citrus sinensis* atacadas pela bactéria *Xanthomonas axonopodis*, causadora do cancro cítrico, por RMN HR-MAS de ^1H combinado com a PCA. De acordo como os autores, as folhas e as cascas dos frutos apresentaram alterações bioquímicas causadas pela bactéria. Além disso, a análise de PCA dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H evidenciou alterações no metabolismo defensivo de *Citrus sinensis*, dentre elas, mudanças relevantes no conteúdo de aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e terpenoides da planta.

Fumagalli et al. (2009) investigaram o perfil metabólico dos brotos e raízes de duas cultivares de arroz ('Arborio' e 'Nipponbare') submetidas à seca e ao estresse salino através da RMN HR-MAS de ^1H e RMN de ^1H em solução. Segundo os autores, a cultivar 'Arborio' foi mais sensível ao estresse salino e à restrição hídrica do que a cultivar 'Nipponbare'. A partir da PCA, verificaram que as plântulas de 'Arborio' acumularam uma maior concentração de aminoácidos e açúcares do que as de 'Nipponbare'.

Choze et al. (2012), relataram a aplicação da RMN HR-MAS e FT-IR na diferenciação de três diferentes cultivares de feijões, provenientes de genótipos silvestres ou transgênicos. De acordo com os autores, as condições de plantio não apresentaram influência significativa na capacidade de distinguir feijões transgênicos dos convencionais. Contudo, os autores relataram a superexpressão dos compostos quercetina e miricetina nos grãos transgênicos.

Diante desse contexto, as técnicas de RMN HR-MAS e RMN em solução, associadas à análise estatística multivariada, têm sido uma ferramenta poderosa para correlacionar as semelhanças e as diferenças no perfil metabólico de alimentos e plantas.

1.3.1 Espectroscopia de RMN quantitativa (RMN_q) e suas aplicações

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta analítica conhecida principalmente pela sua potencialidade na identificação estrutural e no estudo da dinâmica e interação molecular de compostos orgânicos (CLARIDGE, 2009; WISHART, 2008). Além dessas aplicações, a RMN pode ser utilizada como uma técnica quantitativa, conhecida com RMNq, a qual não necessita de padrões idênticos aos compostos a serem quantificados (PAULI et al., 2014).

As primeiras medidas quantitativas por RMN foram descritas por Jungnickel e Forbes (1963) e Hollis et al. (1963). O primeiro determinou a razão de hidrogênios intramoleculares de uma mistura contendo 26 compostos orgânicos, e o segundo reportou a determinação de uma mistura de aspirina, fenacetina e cafeína em preparações de analgésicos comerciais. O advento de campos magnéticos mais fortes, sondas de detecção inversas e criosondas, por exemplo, contribuiu para a consolidação da RMNq.

A RMNq tem sido aplicada em diversas matrizes como alimentos (OHTSUKI et al., 2015), extratos de plantas (PAULI et al., 2012; DONG et al., 2018b), bebidas (CAMPO et al., 2010), células (KOSTIDIS et al., 2017), biofluidos (SILVA et al., 2013; GRAAF ; BEHAR, 2003), drogas ilícitas (HAYS, 2005) e medicamentos (HOLZGRABE, 2010; MONAKHOVA et al., 2014), entre outras.

A principal vantagem da RMNq é a possibilidade de quantificar múltiplos compostos simultaneamente em uma mistura complexa (PAULI et al., 2012; KOSTIDIS et al., 2017; SIMMLER et al., 2014). Os fundamentos da RMNq têm sido reportados em vários livros-texto (CLARIDGE, 2009; HOLZGRABE, DIEHL; WAWER, 2008; DUYNHOVEN; VELZEN; JACOBS, 2013). Em geral, os experimentos de RMN 1D de ^1H e dos heteronúcleos ^{19}F , ^{31}P e ^{13}C , bem como experimentos de RMN 2D como HSQC e JRES são realizados em análises quantitativas (GIRAUDEAU, 2014).

A relação fundamental das medidas quantitativas por RMN é que a área integrada do sinal (I_x) em um espectro de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos (N_x) que absorvem energia na região de radiofrequência referente a este sinal de ressonância que é dada pela equação:

$$I_x = K_s \cdot N_x \quad (2)$$

em que a K_s é a constante do espectrômetro; A_x é a área do sinal e N_x é o número de núcleos relativos ao sinal do composto a ser quantificado. A constante do espectrômetro permanece a mesma para todas as ressonâncias em um espectro de RMN (PAULI et al., 2012; BHARTI & ROY, 2012; HOLZGRABE, DIEHL & WAWER, 2008).

Os métodos quantitativos realizados a partir da técnica de RMN são a quantificação relativa (normalização) ou quantificação absoluta (uso do padrão interno e externo). A quantificação relativa consiste em determinar a razão molar n_x/n_y de dois compostos X e Y diretamente, utilizando as integrais (I) dos sinais separados, considerando o número de núcleos N :

$$\frac{n_X}{n_Y} = \frac{I_X}{I_Y} \cdot \frac{N_Y}{N_X} \quad (3)$$

A constante K_s pode ser desconsiderada quando as intensidades de sinal são comparadas. Em consequência, a fração molar de um composto X em uma mistura de m componentes é dada por:

$$\frac{n_X}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{I_X/N_X}{\sum_{i=1}^m I_i/N_i} \cdot 100\% \quad (4)$$

Para a determinação da concentração de um composto, uma substância com uma concentração conhecida deve ser utilizada. Essa determinação é conhecida como método de quantificação absoluta. O método do padrão interno permite a determinação da massa de um composto em uma matriz a partir de um padrão interno pureza conhecida que é dada pela equação (5):

$$P_X = \frac{I_X \cdot N_{PI} \cdot MM_X \cdot m_{PI} \cdot P_{PI}}{I_{PI} \cdot N_X \cdot MM_{PI} \cdot m} \quad (5)$$

em que P é a pureza (% m/m); I é a área da linha de ressonância; N é o número de núcleos que absorvem na frequência da linha de ressonância; MM é a massa molar e m é a massa pesada (HOLZGRABE, 2010; PAULI et al., 2014).

Os métodos de quantificação absoluta utilizando padrões externos podem ser realizados de três formas (HOLZGRABE, 2010; PAULI et al., 2014). O primeiro pela inserção de um tubo coaxial contendo a referência no tubo de RMN que contém o(s) composto(s) a serem quantificados. O segundo, conhecido como referência externa, é realizado através da comparação de dois espectros: um da amostra de interesse e outro da referência de concentração conhecida. E o terceiro, utiliza o sinal do solvente ou do referencial interno (TMS ou DSS, por exemplo) como padrão interno. Este método não é recomendado para solventes altamente voláteis (HOLZGRABE, 2010; PAULI et al., 2014).

Em geral, os critérios de escolha do padrão interno são: alta pureza, estabilidade, baixo custo, ausência de sinal sobreposto com o analito, inércia química, não-volátil, não-higroscópico e solúvel no solvente deuterado em que a amostra foi solubilizada. Os padrões de referência certificados são reportados por Pauli et al. (2005), Sigma Aldrich (2019) e Weber et al. (2014).

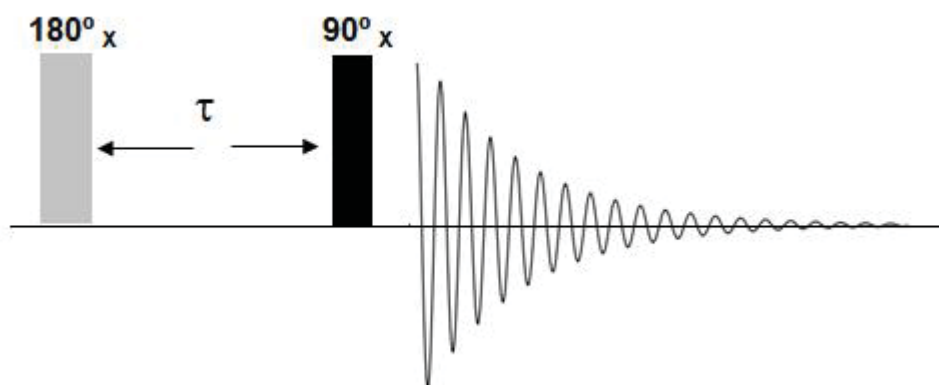
Um dos principais pré-requisitos para as medidas quantitativas é que o sinal usado para a quantificação não deve estar sobreposto a outros sinais. Para isso, experimentos de RMN homo e heteronuclear podem ser utilizados para determinar a pureza do(s) composto(s) de interesse (HOLZGRABE, DIEHL & WAWER, 2008).

Para garantir as condições quantitativas da RMNq devem ser padronizados os parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN. Os procedimentos são detalhadamente discutidos por Pauli et al. (2014), Holzgrabe (2010), Bharti e Roy (2012), e Malz e Jancke (2005). Dentre os parâmetros de aquisição, o tempo de espera entre as aquisições (D1, Bruker Biospin) é um dos parâmetros essenciais nos experimentos de RMNq. O ajuste do D1 é necessário para garantir que todos os spins nucleares relaxem completamente após pulsos de excitação, a fim de evitar determinações subestimadas da magnetização dos sinais investigados. Esse parâmetro pode ser estimado a partir do experimento de inversão-recuperação, que consiste em uma sequência com dois pulsos (FIGURA 10, p. 35).

Nesse experimento, os pacotes de spins são submetidos a um pulso de 180° (pulso de inversão) e a magnetização que se iniciou ao longo do eixo +z, após esse pulso irá para o eixo -z. Em seguida, a recuperação da magnetização é realizada em intervalos regulares pela aplicação de um pulso de 90° para criar

magnetização no plano transversal. Com isso, os T_{1s} são obtidos para cada pacote de spins da amostra. Uma vez sendo conhecido o T_1 do pacote de spin mais lento, o D1 é ajustado.

FIGURA 10 - SEQUÊNCIAS DE PULSOS DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO.



Contudo, o tempo de espera entre os pulsos (D1) deve ser longo, de cinco a sete vezes maiores que o tempo de relaxação longitudinal (T_1) para garantir que mais de 99,33% dos núcleos retornem ao seu estado de equilíbrio (CLARIDGE, 2009). O D1 é governado pelas propriedades de relaxação dos núcleos na mistura, e é caracterizado por tempos de relaxação individuais das várias ressonâncias de hidrogênios associadas com a amostra (PAULI et al., 2012; BHARTI & ROY, 2012).

Ao ser utilizado um pulso de 90° , o D1 deve ser cinco a sete vezes o maior $T_{1(máx)}$, ou seja, o T_1 do pacote de spin nuclear mais lento da amostra. Em geral, o D1 maior que 20s é suficiente para satisfazer esta condição, considerando que normalmente são usados pulsos de 90° para excitar os spins nucleares do hidrogênio (CLARIDGE, 2009; PAULI et al., 2014; SIMMLER et al., 2014).

Um grande avanço na RMNq foi o desenvolvimento dos métodos de calibração externa como o ERETIC (*Electronic REference To access In vivo Concentrations*) (AKOKA; BARANTIN; TRIERWEILER, 1997) e PULCON (*Pulse Length-based Concentration measurements*) (WIDER; DRELER, 2006), bem como as abordagens do QUANTAS (*Quantification by Artificial Signal*) (FARRANT et al., 2010) e ERETIC2 (HONG et al., 2013). Estes dois últimos métodos

combinam as principais vantagens do PULCON e ERETIC para determinar a concentração de compostos em uma ampla gama de matrizes (BHARTI; ROY, 2012; PAULI et al., 2012; HONG et al., 2013).

Basicamente, o método de calibração externa, ERETIC, utiliza uma amostra contendo um composto de concentração conhecida como referência para gerar um sinal artificial eletrônico que é proporcional à concentração do(s) composto (s) de interesse (HOLZGRABE, 2010). Por conseguinte, as áreas dos sinais a serem quantificados nas amostras testadas são comparadas com a área do sinal eletrônico da amostra de referência para determinar a sua concentração (FARRANT et al., 2010; HONG et al., 2013). Para isso, é necessário que o sinal do composto de interesse não esteja sobreposto, e o espectro do padrão de referência deve ser adquirido com as mesmas condições quantitativas de análise das amostras.

A RMNq também possibilita quantificar os metabólitos de interesse diretamente em matrizes no estado semissólido através da técnica de RMN HR-MAS. A metodologia de aquisição de medidas quantitativas através da RMN HR-MAS é semelhante à RMN em solução. Uma ampla gama de matrizes tem sido analisada por meio da técnica de RMN HR-MAS utilizando o método ERETIC, como células tumorais do cérebro (MARTINÉZ-BISBAL et al., 2006), e plantas (DELGADO-GOÑI et al., 2013), tornando-se mais uma alternativa para obter informações quantitativas de amostras *in natura*.

1.4 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

1.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A quimiometria é a área da química que aplica conhecimentos estatísticos, matemáticos e computacionais para auxiliar no tratamento e interpretação de parâmetros químicos de natureza multivariada (FERREIRA, 2015; BRERETON, 2003). Essa ferramenta fornece diversas técnicas para a análise exploratória de dados multivariados, bem como a construção de estratégias de calibração e classificação para prever respostas quantitativas e qualitativas com base nos dados experimentais obtidos das amostras (BRERETON, 2003).

Basicamente, há três tipos de métodos quimiométricos que podem ser utilizados: não-supervisionado, supervisionado e de regressão. O método não-supervisionado é uma técnica de análise exploratória de dados que não necessita do conhecimento prévio acerca da classificação das amostras. Além disso, é considerado a primeira e fundamental etapa de processamento de dados quimiométricos. O método não-supervisionado mais utilizado é a análise de componentes principais (PCA) (FERREIRA, 2015; SAVORANI et al., 2013).

Por outro lado, o método supervisionado é uma ferramenta de predição em que cada amostra analisada advém de uma classe pré-estabelecida e são utilizadas na construção e classificação dos modelos (SAVORANI et al., 2013). Um método supervisionado comumente empregado é a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). E os métodos de calibração ou regressão tem o objetivo de encontrar a relação funcional que melhor se aproxima da resposta com base nas medições, por exemplo: PLS, PCR e MLR.

A PCA é um método utilizado para projetar os dados multivariados de grande dimensionalidade em um espaço de dimensão menor, reduzindo a dimensionalidade sem a perda de informações relevantes mantendo as relações entre as amostras (SAVORANI et al., 2013; FERREIRA, 2015). Esta técnica expressa a maior variância dentro de um conjunto de dados utilizando um menor número de componentes denominadas componentes principais. A PCA permite encontrar similaridades e diferenças entre as amostras e as variáveis (FERREIRA, 2015).

Além disso, a PCA permite a identificação de amostras anômalas (*outliers*), que são aquelas que apresentam um comportamento atípico e podem influenciar incorretamente no conjunto amostral. As amostras anômalas podem ser oriundas da preparação ou manipulação da amostra de forma incorreta, bem como, de

artefatos instrumentais, ou simplesmente pela amostra não seguir um padrão (FERREIRA, 2015). Inicialmente, ao ser identificado um *outlier* em potencial, é importante investigar as razões do comportamento atípico da amostra para então decidir removê-la do conjunto amostral ou não, e posteriormente, se necessário, recalcular a PCA.

Os dados utilizados para PCA são transformados em matrizes (X), nas quais cada amostra é representada por um vetor-linha e cada variável por um vetor-coluna. Relacionando-se aos dados de RMN, cada amostra é representada por um espectro (linhas da matriz X) e as variáveis são os deslocamentos químicos (colunas da matriz X). A conversão do conjunto de dados original por PCA resulta em duas matrizes conhecidas como *scores* e *loadings* (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015).

Em um gráfico de *scores*, cada ponto (amostra) representa um espectro e mostra como eles estão relacionados uns com os outros. Assim, os pontos que estão próximos entre si apresentam perfis espectrais semelhantes. Em contrapartida, os pontos mais distantes possuem perfis distintos (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015; SAVORANI et al., 2013). Uma característica importante é que as direções no gráfico de *scores* correspondem à direção no gráfico de *loading* (variáveis). Desse modo, qualquer agrupamento espectral observado no gráfico de *scores* é interpretado pela análise dos *loadings*.

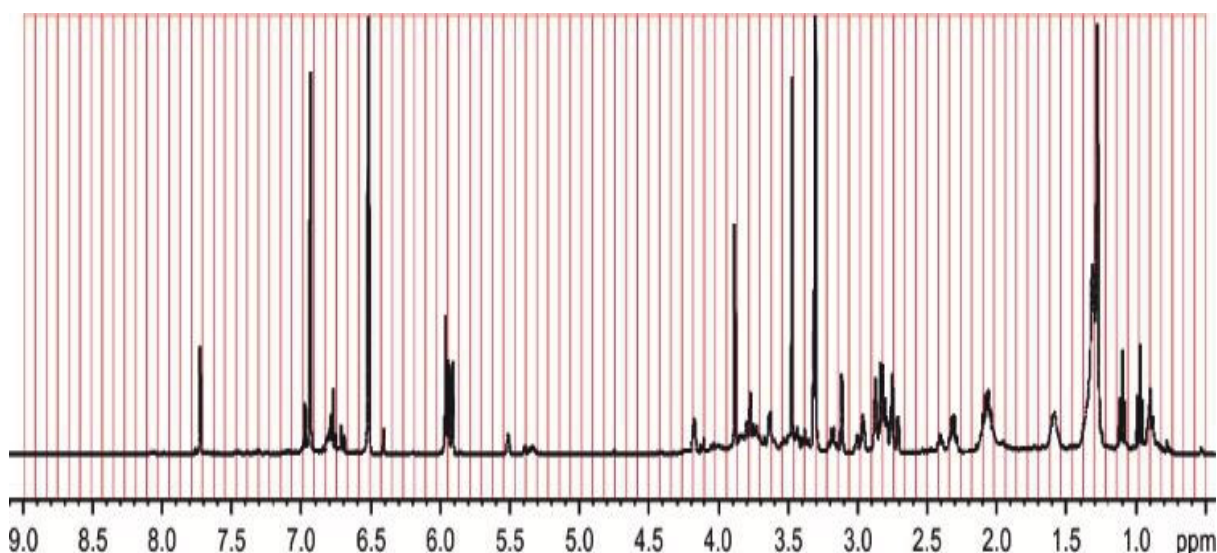
Antes de submeter os dados à PCA, faz-se necessário realizar o pré-tratamento dos dados. O pré-tratamento pode ser dividido em duas etapas: a transformação aplicada às amostras (linhas de X , espectros) e o pré-processamento aplicado às variáveis (colunas de X , deslocamentos químicos). Com relação às amostras (linhas) são aplicadas, entre outras transformações, a correção da linha de base, a normalização, o alinhamento e o *bucketing* (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015).

Os espectros de RMN podem conter milhares de pontos e, portanto, de variáveis. Uma maneira de reduzir a dimensionalidade dos dados é o *binning* ou *bucketing* (FIGURA 11, p. 39). O *bucketing* consiste em dividir o espectro em intervalos iguais ou variáveis (*buckets*). As intensidades de cada *bucket* são somadas de maneira que a área sob a região espectral é utilizada ao invés das intensidades. Portanto, um novo conjunto com menor número de variáveis é

criado, e por ser utilizado *buckets* definidos, os desalinhamentos tendem a ser corrigidos (SOUSA; MAGALHÃES; FERREIRA, 2013).

Nos espectros de RMN podem ocorrer desalinhamentos dos sinais mesmo em condições padronizadas. Isso ocorre devido às interações intermoleculares entre os metabólitos, além de variações de pH e temperatura. Dentre os métodos de transformação que podem ser utilizados em dados de RMN, podemos citar: *Correlation optimized warping (COW)*, *Correlation-shifting (Coshift)* e *Interval-correlation-shifting (Icoshift)* (SAVORANI et al., 2013; SMOLINSKA et al., 2012).

FIGURA 11- *BUCKETING* DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H UTILIZANDO BUCKETS DE 0,08 PPM SOB A REGIÃO ESPECTRAL DE 9,00-0,50 PPM.



Além de realizar o *bucketing*, é importante realizar o escalamento do conjunto amostral, visto que a concentração dos metabólitos pode variar em muitas ordens de magnitude. Em geral, a maior influência dos compostos em PCA ou PLS está relacionada com a concentração dos compostos majoritários (SMOLINSKA et al., 2012). Desse modo, os *softwares* disponibilizam os pré-processamentos de centrar os dados na média, autoescalamento (escalamento por unidade de variância), e o escalamento por Pareto (VAN DEN BERG, 2006; FERREIRA, 2015; SAVORANI et al., 2013).

Para centrar os dados na média, é calculado o valor médio de cada coluna (variável) e esse valor é subtraído de cada um dos valores da coluna. A média

torna-se zero e as diferenças entre as variáveis (metabólitos majoritários e minoritários) tornam-se mais perceptíveis.

No autoescalamento (escalamento por unidade de variância) cada coluna é centrada na média e escalada pelo desvio-padrão. Esse tipo de pré-processamento permite que os metabólitos em maior e menor concentração sejam considerados e tenham pesos similares. O escalamento por Pareto é uma opção intermediária entre os dois anteriores. Neste método é utilizada a raiz quadrada do desvio padrão como um fator de escala. Esse escalamento é sensível as maiores mudanças nos dados, por exemplo, aos compostos em maior concentração (VAN DEN BERG et al., 2006; FERREIRA, 2015; SAVORANI et al., 2013).

Segundo Savorani et al. (2013), o pré-processamento mais utilizado em RMN em que é abordado o perfil metabôlômico é o autoescalamento. Enquanto na abordagem de *fingerprint* metabôlômico são utilizados os dados centrados na média ou o escalamento por Pareto. Segundo os autores, os métodos de escalamento enfatizam diferentes aspectos dos dados experimentais e cada abordagem tem as suas vantagens e desvantagens.

A análise multivariada aliada à espectroscopia de RMN em solução tem contribuído para o controle de qualidade e autenticação de uma variedade de produtos alimentícios de importância para a agricultura, como por exemplo: *ginseng* (LEE et al., 2009); café (WEI et al., 2012); vinho (AMARGIANITAKI; SPYROS, 2017); laranja (SALAZAR et al., 2018), entre outros. Além disso, o chá verde tem sido investigado por RMN em solução para estudar a influência da diferenciação geográfica no chá verde (LEE et al., 2010), a dependência da estação para a safra (LEE et al., 2011), e a autenticidade do chá verde e seus derivados (KELLOGG et al., 2017).

Diante do exposto, a utilização de ferramentas espectroscópicas, como a RMN HR-MAS e RMN em solução combinada com a PCA, torna-se uma alternativa viável para o conhecimento qualitativo e quantitativo dos constituintes químicos do chá verde. Desse modo, o presente trabalho visa contribuir para a geração de dados baseando-se em perfis metabólicos e *fingerprinting* metabólicos através da RMN que melhorem e auxiliem no estabelecimento de padrões de qualidade do chá verde (*C. sinensis*), alimento em crescente consumo pela população.

No presente trabalho, o termo chá verde refere-se ao material vegetal produzido a partir das folhas de *C. sinensis* processadas. No entanto, estudos também foram realizados com o material vegetal *in natura*, para fins de comparação com o material processado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para o controle de qualidade do chá verde (*Camellia sinensis*), utilizando o perfil espectral e *fingerprinting* metabólico através da técnica de RMN HR-MAS aliada à quimiometria.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Otimização dos parâmetros de aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de chá verde;
- ✓ Avaliar a composição química dos chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' durante o período de safra;
- ✓ Identificar os principais constituintes químicos das amostras de chás verdes dos cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori';
- ✓ Avaliar a influência dos parâmetros climáticos na composição química das cultivares de chá verde *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' durante o período de safra;
- ✓ Quantificar os compostos químicos de ambas as cultivares de chá verde pelo método ERETIC;
- ✓ Verificar o potencial do método desenvolvido na avaliação da autenticidade do chá verde comercial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

3.1.1 Amostras de chá verde

As amostras de chá verde das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' foram adquiridas ao longo da safra (sete meses) da empresa Agrochá Boa Vista, localizada em Guajuvira distrito do município de Araucária-PR, Brasil. As amostras de chá verde foram armazenadas na embalagem original em congelador a -18 °C até a realização das análises. As folhas frescas de ambas as cultivares foram liofilizadas e armazenadas em congelador a -18 °C até a realização das análises. Para cada cultivar, sete amostras foram analisadas e estas foram analisadas em triplicata. O conjunto amostral foi composto de 42 espectros de RMN HR-MAS.

3.1.2 Amostras comerciais de chá verde

A amostra de chá verde comercial (CV-1) utilizada como referência foi produzida a partir das folhas dos brotos da cultivar *C. sinensis* 'Yabukita' fornecida pela empresa Agro-chá Boa Vista (Araucária-PR). Os chás verdes comerciais (CV-2 a CV-30) foram adquiridos em supermercados, lojas de produtos naturais e mercados centrais do Brasil. Os chás verdes (CVI-1 e CVI-2) foram adquiridos das cidades de Nishio e Shizuoka, Japão (Tabela 1, p. 44).

As amostras analisadas (sachês ou pacotes) foram armazenadas nas embalagens originais a temperatura ambiente até a realização das análises. O tempo experimental para cada amostra foi de 35 min, incluindo preparo de amostra, empacotamento do rotor e aquisição do experimento. As análises foram realizadas em triplicata resultando em um conjunto amostral de 96 espectros.

3.1.3 Amostras comerciais de erva-mate

As amostras comerciais de erva-mate (EM-1 e EM-2), produzidas a partir das folhas de *Ilex paraguariensis*, foram adquiridas em supermercados. As

amostras analisadas de erva-mate foram armazenadas nas embalagens originais até a realização das análises.

TABELA 1 - AMOSTRAS DE CHÁS VERDES COMERCIAIS ANALISADAS

Amostras	Informação do rótulo (parte da planta utilizada e espécie)	Embalagem
CV-1	F e T (<i>C. sinensis</i> 'Yabukita')	pacote
CV-2	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-3	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-4	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-5	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-6	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-7	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-8	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-9	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-10	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-11	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-12	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-13	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-14	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-15	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-16	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-17	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-18	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-19	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	pacote
CV-20	F e T (<i>C. sinensis</i> (L.) Kuntze)	sachê
CV-21	Chá verde (*)	pacote
CV-22	Chá verde (*)	pacote
CV-23	Chá verde (*)	pacote
CV-24	Chá verde (<i>Ilex paraguariensis</i>)	pacote
CV-25	Chá verde (*)	pacote
CV-26	Chá verde (*)	pacote
CV-27	Chá verde (*)	pacote
CV-28	Chá verde (*)	pacote
CV-29	Chá verde (*)	pacote
CV-30	Chá verde (*)	pacote
CVI-2	F e T (<i>C. sinensis</i>)	pacote

F e T= Folhas e talos; *ausência da indicação da parte da planta e espécie utilizada.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹H

3.2.1 Preparo da amostra

3.2.2.1 Avaliação do solvente deuterado

Os seguintes solventes deuterados foram avaliados: água (D₂O) e metanol (CD₃OD). Os solventes continham o composto de referência interna 3-(trimetilsilil) tetradeuteropropionato de sódio (0,01% de TMSP-*d*₄) e o tetrametilsilano (0,05% de TMS), respectivamente. O rotor (porta-amostra) foi limpo com acetona entre as análises.

3.2.2.2 Tempo de contato da amostra com o solvente

A análise do tempo de contato da amostra com metanol deuterado foi realizada. Para isso, os seguintes tempos de contato da amostra vegetal com o metanol foram avaliados: 5, 10, 15 e 20 min, em comparação à análise imediata. Para cada tempo avaliado foi adquirido um espectro de RMN HR-MAS de ¹H e um rotor empacotado contendo 10 mg de amostra e 40 µL de CD₃OD.

3.3 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO

3.3.1 Sequências de pulsos

As sequências de pulsos de pré-saturação avaliadas foram: *zgpr* e *noesypr1d*. Inicialmente, as sequências de pulsos foram analisadas com um tempo de espera entre a aquisição e o próximo pulso (D1) de 1s. Para a *noesypr1d*, foi avaliado o tempo de mistura (D8) variando-o de 50, 100 e 150 ms.

3.3.1 Número de transientes

Após a seleção da sequência de pulsos de pré-saturação adequada para as análises, foi analisado o número de transientes de 64, 128, 256 e 512. Os

resultados foram considerados em função da eficiência na saturação do sinal residual da água (HDO) e relação sinal–ruído.

3.3.2 Velocidade de giro do rotor

As velocidades de giro do rotor testadas foram 4, 5 e 6 kHz. Para cada velocidade de giro, um rotor de 50 μ L foi empacotado com 10 mg de amostra em 40 μ L de CD₃OD e foi adquirido um espectro de RMN HR-MAS de ¹H utilizando a sequência de pulsos *zgpr*, 256 transientes e D1 de 1s.

3.3.3 Ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*)

O parâmetro *shimming* foi monitorado a partir da medida da largura da meia altura do sinal do TMS. Todas as amostras foram otimizadas para uma largura da meia altura do sinal do TMS < 1 Hz.

3.4 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹H QUANTITATIVO DAS CULTIVARES DE CHÁ VERDE

Os chás verdes das cultivares (*C. sinensis* ‘Yabukita’ e *C. sinensis* ‘Yutakamidori’) foram submetidos ao resfriamento com nitrogênio líquido, e posteriormente foram pulverizados manualmente em um almofariz de porcelana. Para cada análise, 10 mg de amostra foram empacotados em um rotor (porta-amostra) de ZrO₂, semiesférico, com um volume de 50 μ L. Em seguida, adicionou-se 40 μ L de CD₃OD (0,05% de TMS). As análises das amostras foram realizadas em triplicata. As amostras vegetais foram armazenadas no congelador a -18 °C até posterior análise (FIGURA 10, p. 49). A pesagem das amostras foi realizada em uma balança semi-microanalítica, modelo AUW 220D, da Shimadzu (capacidade máxima 220 g e precisão 0,01 mg).

Os espectros de RMN HR-MAS de ¹H foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance II 400 (9,4 T) observando o núcleo de ¹H a 400 MHz, equipado com uma sonda quadrinuclear (¹H; ¹³C; ¹⁵N, ²H) de alta resolução de 4 mm MAS, com gradiente de campo na direção do ângulo mágico ($\theta = 54,74^\circ$)

a 298 K. A sequência de pulsos *zgpr* foi utilizada para a pré-saturação do sinal residual de água. O ângulo mágico (MAS) foi ajustado diariamente, enquanto a sintonia (*matching* e *tunning*) e o *shimming* foram ajustados para cada amostra.

Além disso, a calibração do pulso de 90° foi otimizada considerando $p_{w90} = \frac{1}{4} p_{w360}$ para $p1 = 5,15 \mu\text{s}$. As condições quantitativas em RMN foram determinadas assegurando os parâmetros reportados por Pauli et al. (2014). Para determinar o tempo de espera entre os pulsos (D1) foi realizado o experimento de inversão-recuperação variando o tempo de 0,01, 0,25, 0,05, 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 5,0 s. Os espectros foram registrados com 256 transientes, tempo de aquisição de 4,0 s (AQ), com 64 K pontos (TD) durante a aquisição, utilizando uma janela espectral de 8012,820 Hz, e ganho do receptor de 114. Da mesma forma, os espectros foram referenciados em relação ao sinal do TMS em $\delta_{\text{H}} 0,00$.

Os experimentos foram realizados com uma velocidade de giro do rotor de 5 kHz. Os espectros foram processados com o *software* TopSpin (versão 3.2, Bruker BioSpin Inc.), utilizando uma multiplicação exponencial nos FIDs por um fator de 0,3 Hz. As fases foram corrigidas manualmente e as linhas de base automaticamente. Para as medidas quantitativas, o tempo experimental total foi de 2h para cada amostra incluindo preparo da amostra e o empacotamento do rotor. As análises foram realizadas em triplicata resultando em um conjunto amostral de 21 espectros para cada cultivar de chá verde analisada.

3.4.1 Quantificação pelo método ERETIC

As concentrações absolutas do ácido linolênico, teanina, *epi*-catequina e cafeína foram obtidas por meio de um sinal digital artificial ERETIC, que foi adicionado em $\delta_{\text{H}} -1,0$ ppm na última etapa de processamento. A equivalência do sinal digital ERETIC (em número de mols) foi calculada a partir dos espectros RMN HR-MAS de ^1H com base na área do sinal de uma solução de timol 25 mM

preparada em metanol deuterado (MARTÍNEZ-BISBAL et al. 2009, AKOKA et al. 1999).

As condições experimentais utilizadas nessa etapa foram: sintonia da sonda para o núcleo de ^1H (*tuning* e *matching*), inserção do rotor no espectrômetro, velocidade de giro, sequência de pulsos e temperatura. Os sinais dos metabólitos do chá verde utilizados para a quantificação foram: ácido linolênico (δ_{H} 0,97, 3H), teanina (δ_{H} 1,11, 3H), *epi*-catequina (δ_{H} 6,97,1H) e cafeína (δ_{H} 7,78, 3H). Esses compostos foram quantificados com o software Topspin versão 3.1 (Bruker BioSpin). As concentrações de metabólitos foram calculadas usando a seguinte equação:

$$\text{Quantidade (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{I_x \cdot \text{EQ}_{\text{ERETIC}}}{H_x \cdot g_{\text{SAMPLE}}} \text{MM}_x \cdot 10^3$$

onde I_x é o valor integral do sinal do analito, H_x representa o número de hidrogênios integrados na ressonância de X, MM_x corresponde à massa molar do analito, $\text{EQ}_{\text{ERETIC}}$ é a equivalência calculada em mol do sinal ERETIC de acordo com a solução de timol e g_{SAMPLE} é a massa da amostra em gramas (MARTÍNEZ-BISBAL et al. 2009, AKOKA et al. 1999). O teor dos metabólitos do chá verde foi apresentado como a média de três análises (ANEXO 1, p. 154).

3.4.2 Análise estatística

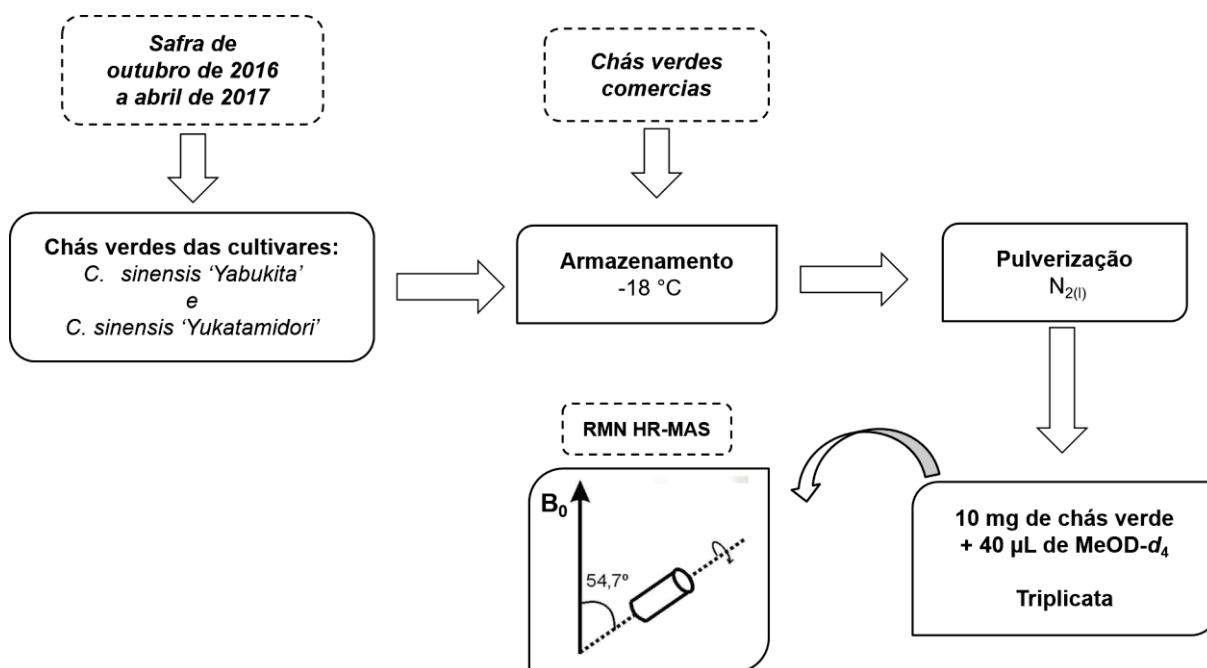
As áreas dos sinais responsáveis pela discriminação na análise de PCA foram determinadas e submetidas à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade.

3.5 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H QUALITATIVOS DOS CHÁS VERDES COMERCIAIS

As amostras de chás verdes comerciais foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo de amostra e armazenagem que os chás verdes dos cultivares YBP e YMP para aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H . Da mesma forma, os espectros foram adquiridos e processados nas mesmas

condições dos cultivares, exceto o tempo de espera entre os pulsos (D1) que assumiu o valor de 1,0 s (FIGURA 12).

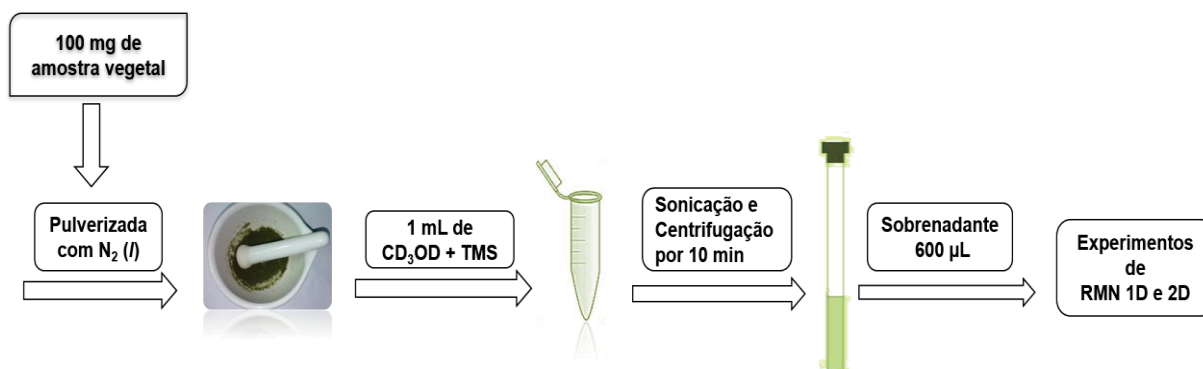
FIGURA 12 - METODOLOGIA UTILIZADA ABRANGENDO A OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS ATÉ A AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H .



3.6 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS EM SOLUÇÃO

Para os experimentos bidimensionais de RMN em solução, 100 mg do chá verde da cultivar (*C. sinensis* 'Yabukita') foram pulverizadas com N_2 líquido e submetidas a microextração em 1 mL de CD_3OD (0,05% de TMS). Em seguida, foi realizada a sonicação e a centrifugação da amostra por 10 min cada. Uma alíquota de 600 μL do sobrenadante foi coletada e adicionada a um tubo de RMN de 5 mm para posterior análise (FIGURA 13).

FIGURA 13 - METODOLOGIA UTILIZADA PARA A AQUISIÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE RMN EM SOLUÇÃO.



Os experimentos bidimensionais de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) foram adquiridos em um espectrômetro Bruker AVANCE III 600, operando a 14,7 T, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 600 e 150 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda quadrinuclear de detecção inversa (^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P) de 5 mm, e com gradiente de campo no eixo z. A temperatura para a aquisição dos experimentos foi de 303 K.

Os experimentos de RMN HSQC foram realizados no modo sensível à fase, empregando seleção de gradiente Echo/Antiecho-TPPI, com sequência de pulsos *hsqcetgpsisp2.2* desacoplado durante a aquisição. Os experimentos de RMN HSQC foram realizados com tempo de espera de 1,0 s entre os pulsos. Na dimensão F2 foram utilizados 2K pontos, com 32 aquisições para cada um dos 312 incrementos na dimensão em F2 para gerar a segunda dimensão, completando com zeros (*zero filling*) para 1K anteriormente a transformada de Fourier.

Os experimentos de RMN (^1H - ^{13}C) HMBC foram realizados no modo sensível à fase, empregando seleção de gradiente *Digital Quadrature Detection* (DQD) com sequência de pulsos *hmbcgpplpndqf*, sem o desacoplamento durante a aquisição. Foi utilizado filtro de $^1J_{\text{H,C}}$ para eliminar acoplamentos à uma ligação, sendo otimizado para a observação da constante de acoplamento à longa distância de 8 Hz. Os experimentos de RMN (^1H - ^{13}C) HMBC foram realizados com 2K pontos na dimensão F2, com 80 aquisições para cada um dos 312 incrementos na dimensão em F2 para gerar a segunda dimensão, completando com zeros (*zero filling*) para 1K anteriormente a transformada de Fourier.

A metodologia descrita acima também foi utilizada para a aquisição de experimentos de RMN 2D das amostras CV-1, CV-24 e EM-1.

3.7 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H

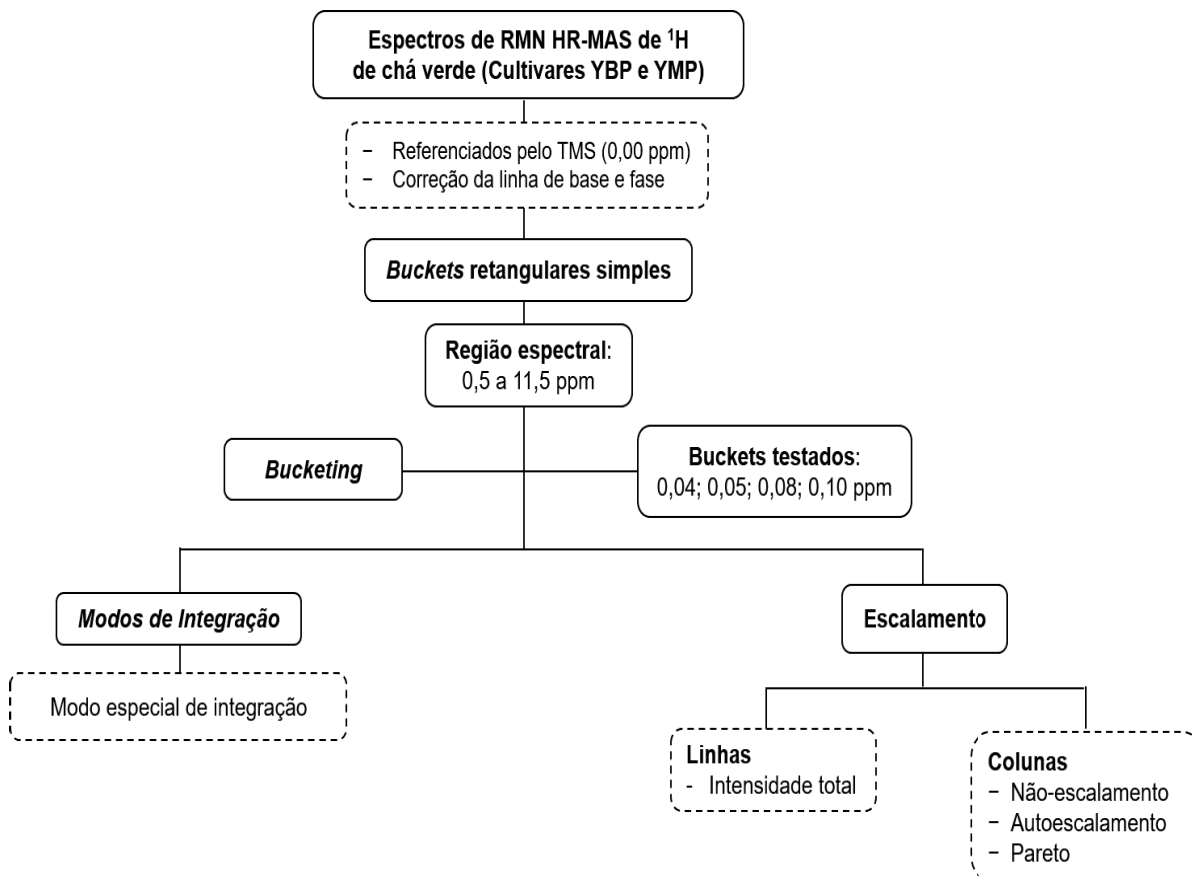
A otimização da análise multivariada dos dados foi realizada com o auxílio do *software* AMIX® (versão 3.9.12, Bruker BioSpin). Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram pré-processados através do ajuste da fase dos sinais, correção de linha de base, exclusão de regiões, *bucketing* e escalamento (FIGURA 12, p.51).

Inicialmente, ajustou-se a linha de base e a fase dos espectros manualmente, garantindo que as variáveis utilizadas estivessem em função apenas da composição química das amostras. Em seguida, os espectros foram referenciados em relação ao sinal do TMS (δ_{H} 0,00). As áreas referentes aos sinais residuais de água (δ_{H} 4,80-4,70), acetona (δ_{H} 2,16-2,14), utilizada como solvente de limpeza do rotor entre as análises, e do metanol (δ_{H} 3,33-3,29) foram excluídas antes de gerar os *buckets*.

Para alinhar os espectros, foram avaliados os seguintes tamanhos de *buckets*: 0,04; 0,05; 0,08 e 0,10 ppm. O monitoramento da PCA foi realizado observando a formação dos agrupamentos (*scores*) e a discriminação dos compostos responsáveis pelos agrupamentos através dos *loadings*. Cada matriz dos chás verdes (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori') foi composta por uma matriz 21 x 107, em que 21 correspondem às amostras de chá verde em triplicata dos sete meses de colheita avaliados (linhas) e 107, aos valores dos deslocamentos químicos e as variáveis (colunas).

Os pré-processamentos disponibilizados pelo *software* AMIX® foram testados: nas linhas, escalamento em relação à intensidade total dos sinais e não escalamento, e nas colunas: escalamento de variância unitária, Pareto e não escalamento, conforme a FIGURA 14 (p. 51). Esses pré-processamentos foram testados para os dois conjuntos amostrais de chá verde.

FIGURA 14 - MÉTODOS TESTADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE MULTIVARIADA ATRAVÉS DO SOFTWARE AMIX®.



3.8 PARÂMETROS CLIMÁTICOS

Os parâmetros climáticos utilizados foram: as temperaturas máxima e mínima (°C), radiação solar (W/m²), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm). O período analisado foi de outubro de 2016 a abril de 2017, totalizando sete meses. Os parâmetros climáticos foram fornecidos pelo Sistema de Meteorologia do Paraná (SIMEPAR), e foram provenientes da estação meteorológica de Curitiba.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹H

O controle de qualidade de plantas através da utilização do perfil metabólico e do *fingerprinting* metabólico requer a avaliação de fatores que garantam a aquisição do máximo de informação nos espectros de RMN. Para isso, foram avaliados os parâmetros associados com o preparo da amostra e a aquisição dos espectros.

O preparo de amostra consistiu na avaliação de solventes deuterados e no tempo de contato com o solvente (FLORES et al., 2019). A aquisição dos espectros foi realizada avaliando-se as sequências de pulsos (*zgpr* e *noesypr1d*), número de transientes, velocidade de giro do rotor e o ajuste da homogeneidade do campo magnético espacialmente (*shimming*).

4.1.2 Preparo de amostra

4.1.3 Avaliação do solvente

A utilização do solvente deuterado na técnica de RMN HR-MAS tem a finalidade de monitorar a variação do campo magnético temporalmente (*lock*) através do sinal do deutério, bem como, aumentar a mobilidade molecular dos metabólitos na matriz investigada (FLORES et al., 2019; BECKONERT et al., 2010). A detecção dos componentes químicos nos espectros de RMN HR-MAS depende da mobilidade molecular que pode ser melhorada com a penetração do solvente na matriz heterogênea. A escolha do solvente depende principalmente da informação requerida em cada tipo de amostra (FAROOQ et al., 2013; FLORES et al., 2019).

No presente estudo, objetivou-se analisar a composição química do chá verde que consiste, principalmente, em aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, açúcares, flavonóides e xantinas (LEE et al., 2011). Assim, considerando a polaridade desses metabólitos, os solventes deuterados água e metanol (D₂O e CD₃OD) foram avaliados FIGURA 13 e FIGURA 14, p. 55.

Através da análise do perfil metabólico do chá verde por RMN HR-MAS de ^1H (FIGURAS 15 e 16, p. 54 e 55) pôde-se inferir que o metanol possibilitou maior mobilidade molecular aos compostos químicos polares e pouco polares presentes no chá verde e, a água permitiu maior mobilidade aos metabólitos mais polares.

Assim, a utilização do metanol deuterado (CD_3OD) permitiu a obtenção de um espectro com maior resolução espectral, e, portanto, mais informativo em comparação à análise utilizando-se água deuterada. Devido a essas características, o metanol deuterado foi escolhido para análise das amostras de chá verde por ter viabilizado a identificação de um maior número de metabólitos, quantificação e análise quimiométrica.

FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') UTILIZANDO A SEQUÊNCIA DE PULSOS (zgpr) EM DIFERENTES SOLVENTES DEUTERADOS.

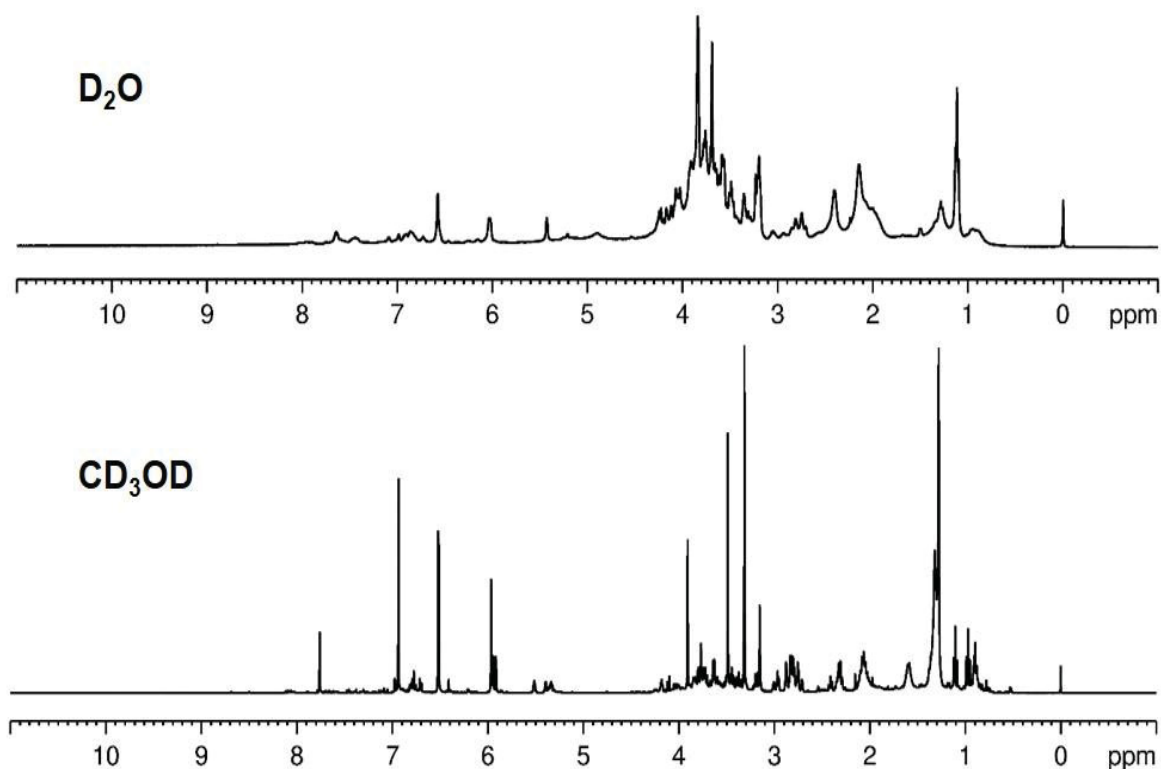
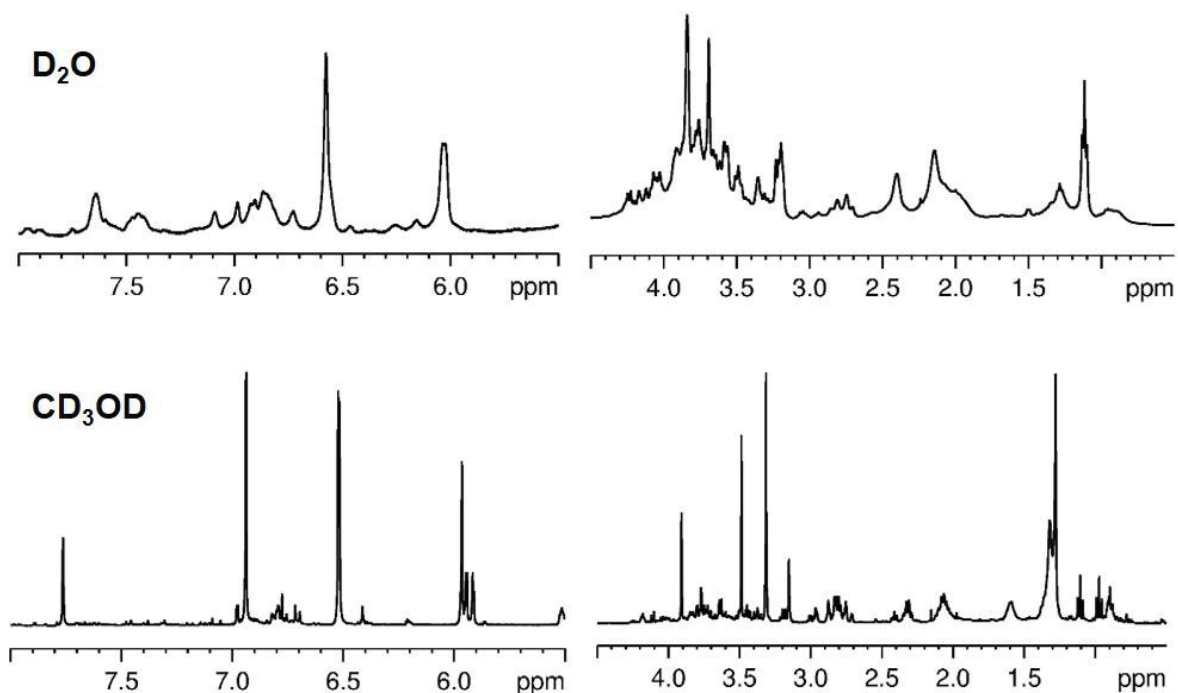


FIGURA 16 - AMPLIAÇÃO DAS REGIÕES ENTRE δ 8,00-5,95 E δ 4,50-0,50 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') EM DIFERENTES SOLVENTES DEUTERADOS.



4.1.4 Avaliação do tempo de contato da amostra com o solvente

Os perfis metabólicos das folhas de chás verdes das cultivares (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori') não apresentaram mudanças significativas ao variar o tempo de contato do metanol deuterado com as amostras (FIGURAS 17 e 18, p. 56). Desse modo, a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H foi realizada logo após a inserção da amostra no rotor. O tempo selecionado permitiu um bom ajuste do *shimming* resultando em espectros com largura da meia altura do TMS menor que 1 Hz, portanto, com resolução espectral suficiente para a identificação e quantificação dos compostos.

FIGURA 17 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO COM O SOLVENTE.

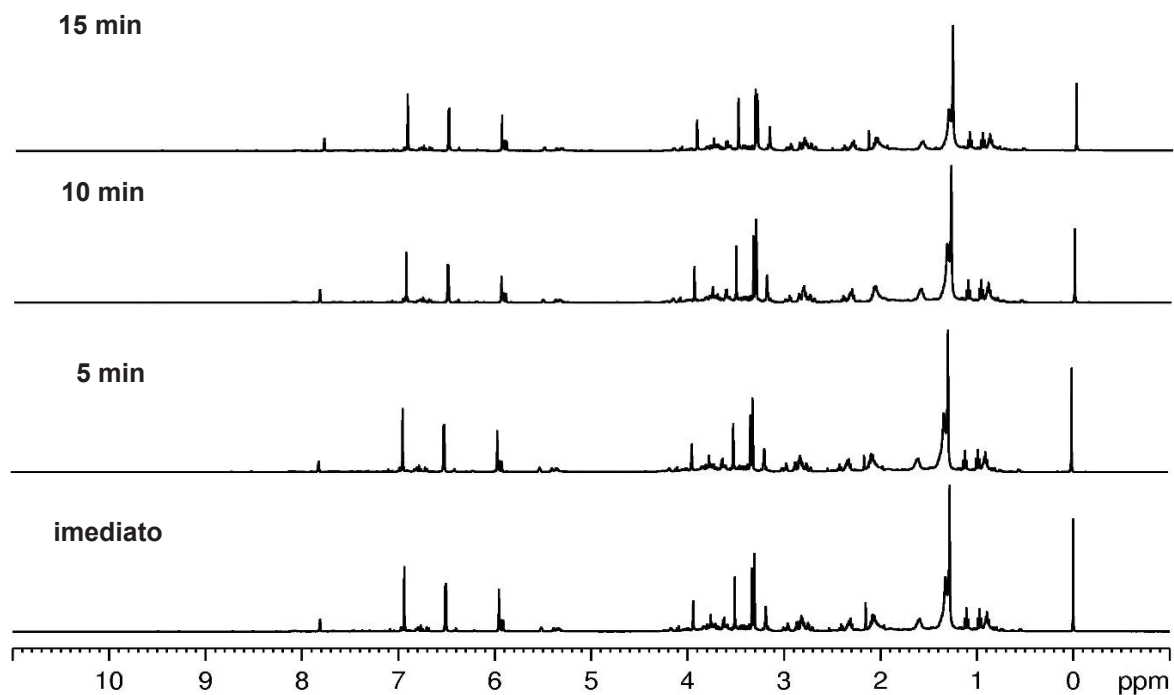
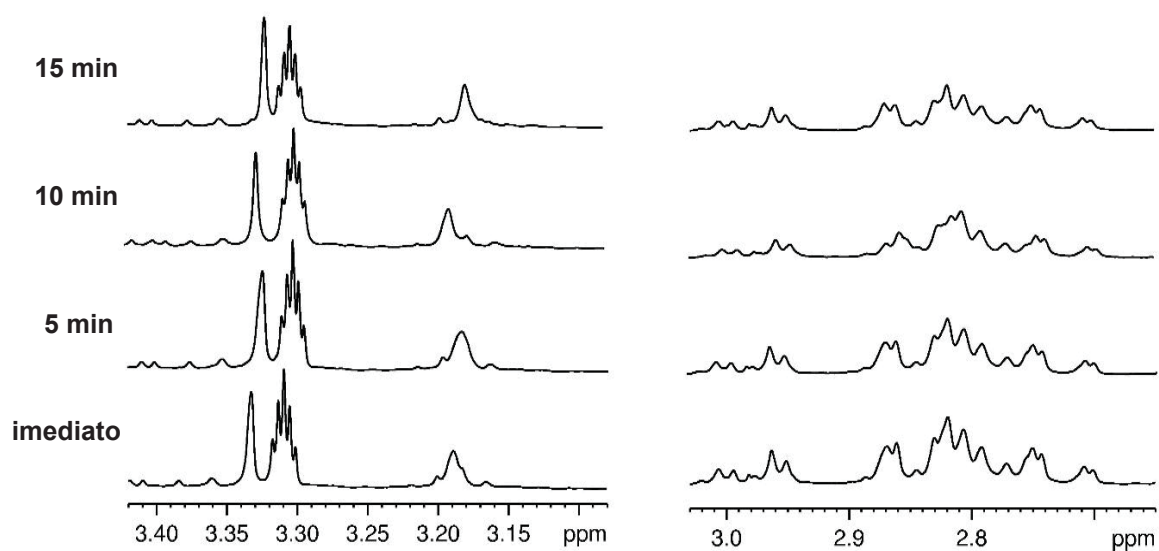


FIGURA 18 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 3,40-2,60 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita')



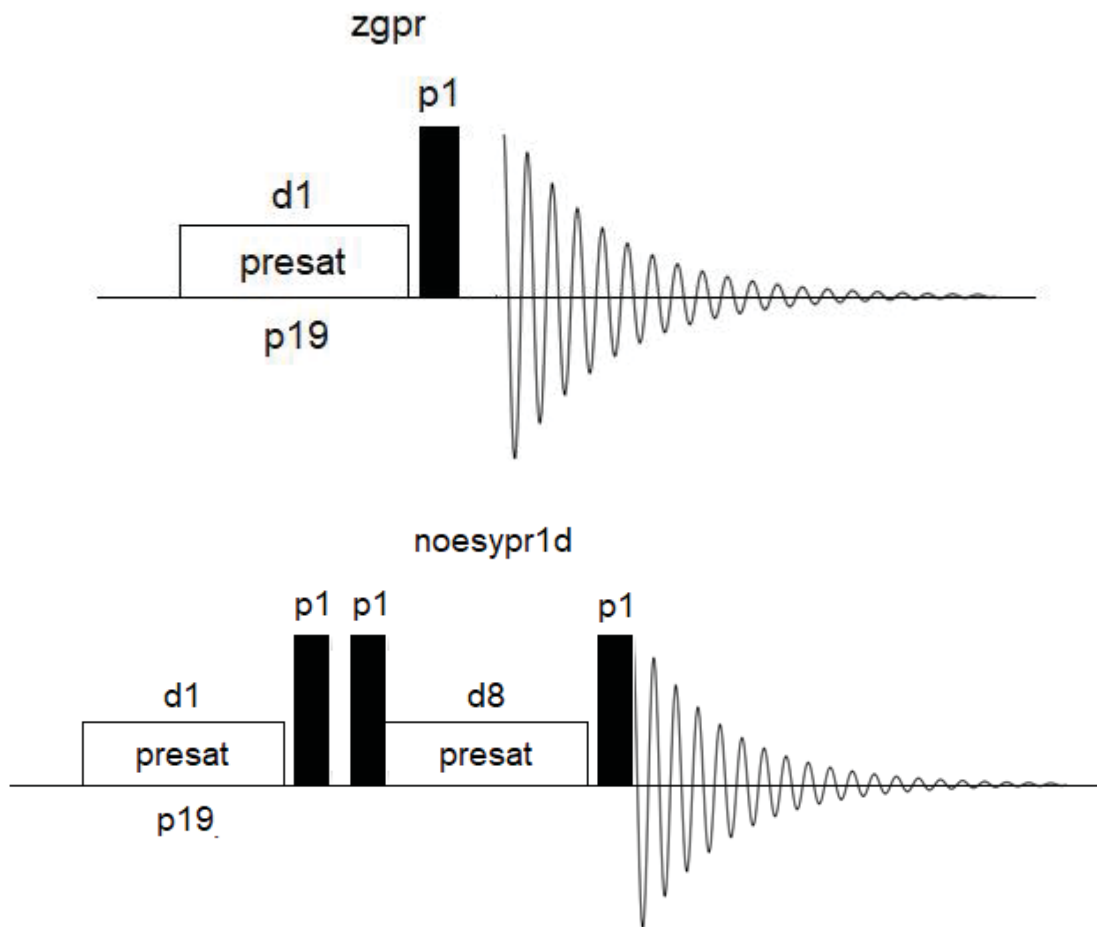
4.2 Aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H

4.2.1 Sequências de pulsos

Os sinais intensos dos solventes podem se sobrepor aos sinais do analito e, ainda podem ocasionar distorções na linha de base e na fase dos sinais. Além disso, sinais muito intensos podem ocasionar limitações instrumentais devido a saturação do ganho no receptor (DUARTE et al., 2013). O procedimento de pré-saturação desses sinais pode ser utilizado através de uma sequência de pulsos específica. A pré-saturação consiste na aplicação de um pulso seletivo de onda contínua de baixa potência na frequência de ressonância do sinal residual do solvente antes do registro do FID.

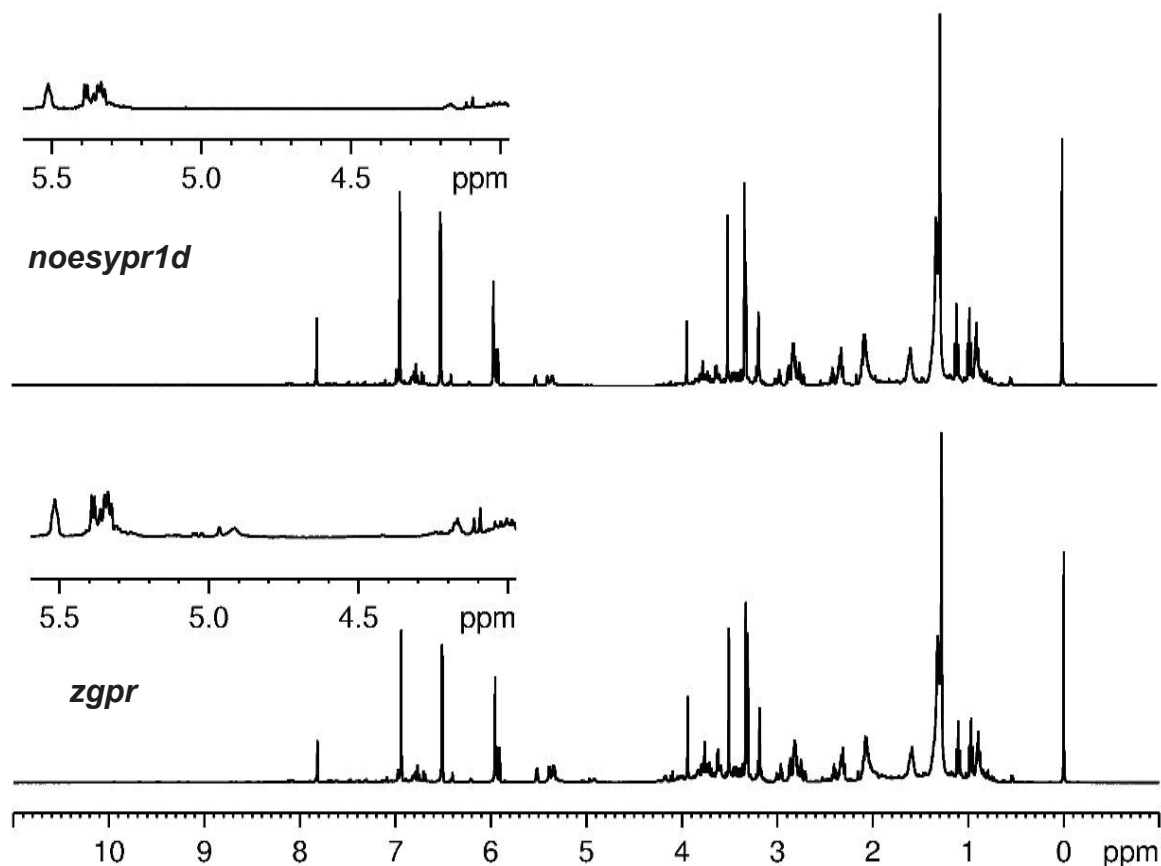
Nesse trabalho, o sinal a ser suprimido foi o sinal referente ao residual de água ($\text{HDO}/\text{H}_2\text{O}$) presente no metanol deuterado e na amostra. Para isso foram testadas duas sequências de pulsos de pré-saturação do sinal: *zgpr* e *noesypr1d* (FIGURA 19, p.58). A primeira sequência de pulsos de pré-saturação *zgpr* (Bruker) consiste em $\text{D1-90}^\circ\text{-FID}$ em que D1 corresponde ao tempo de espera entre os pulsos. A pré-saturação do sinal utilizando *zgpr* ocorre durante o tempo de espera e é considerada seletiva. A segunda sequência, *noesypr1d* é definida como $\text{D1-90}^\circ\text{-t}_1\text{-90}^\circ\text{-t}_m\text{-90}^\circ\text{-FID}$, em que t_1 corresponde a um intervalo fixo de $4 \mu\text{s}$ e t_m equivale ao tempo de mistura (D8). Para a sequência de pulso *noesypr1d*, a saturação do sinal residual da água ocorre durante os tempos D1 e D8.

FIGURA 19 - SEQUÊNCIAS DE PULSOS DE PRÉ-SATURAÇÃO AVALIADAS



A sequência de pulsos de pré-saturação *noesypr1d* proporcionou a saturação do sinal da água. No entanto, foram observados alguns inconvenientes como: supressão de sinais próximos do sinal de ressonância da água e a baixa intensidade dos sinais. Por outro lado, a sequência de pulsos *zgpr* proporcionou a saturação do sinal residual da água sem causar interferências nos sinais vizinhos. Dessa forma, a sequência de pulsos de pré-saturação escolhida para a aquisição dos espectros foi a *zgpr* (FIGURA 20, p. 59).

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS DE PULSOS ZGPR E NOESYPR1D.

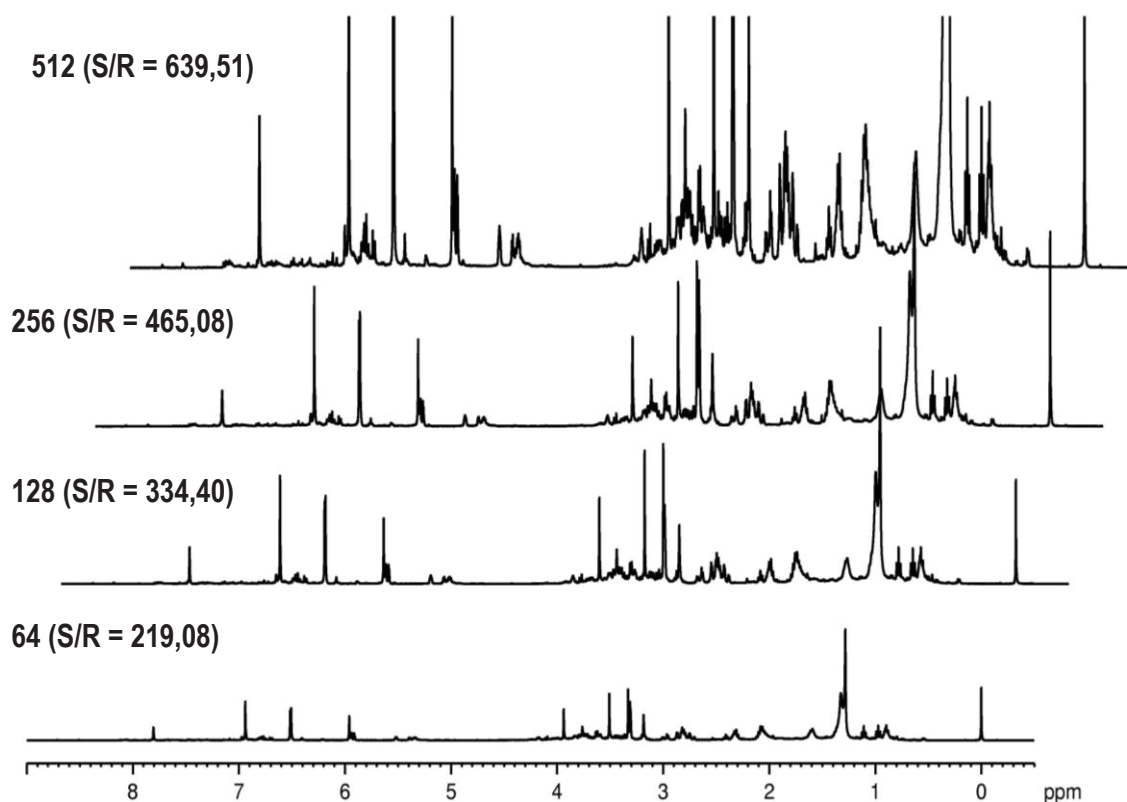


4.2.2 Avaliação do número de transientes

Com a finalidade de obter espectros de RMN HR-MAS de ^1H com uma relação sinal ruído (S/R) maior que 150 foram avaliados os seguintes números de transientes: 64, 128, 256 e 512 (FIGURA 21, p. 60).

À medida que aumenta o número de transientes, aumenta também o tempo de análise. Dessa forma, o espectro de RMN HR-MAS de ^1H utilizando 256 transientes foi escolhido por apresentar uma relação sinal/ruído (S/R) e tempo de análise apropriados. Além disso, a intensidade dos sinais com 256 transientes mostrou-se adequada para a atribuição dos sinais de menor intensidade, bem como a quantificação dos compostos de interesse.

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') ADQUIRIDOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE TRANSIENTES.



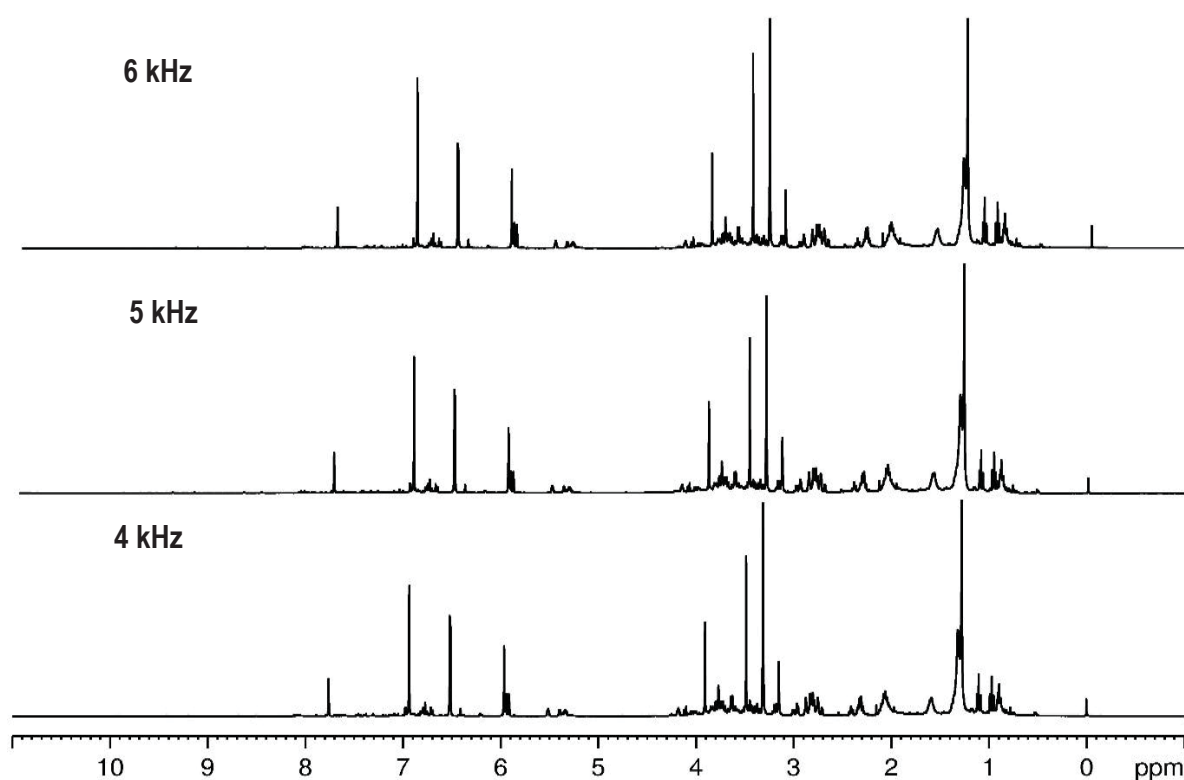
4.2.3 Avaliação da velocidade de giro do rotor

Como pode ser observado, o processo de aquisição de espectros de RMN HR-MAS emprega as mesmas sequências de pulsos utilizadas na RMN em solução. No entanto, o preparo de amostra requer o uso de um rotor (porta-amostra) que gira em torno do ângulo mágico ($\theta = 54,74^\circ$) a altas velocidades. Essas altas taxas são necessárias para deslocar as bandas laterais de giro para fora da janela espectral evitando assim a replicação de sinais (BECKONERT et al., 2010).

A velocidade de giro do rotor é um fator importante a ser avaliado porque a ação da força centrífuga pode ocasionar destruição dos tecidos da amostra. Além disso, as análises de RMN HR-MAS são realizadas com o mínimo de manipulação das amostras o que garante ao máximo o estado *in natura* dessas (RENAULT et al., 2013).

Dessa forma, foram avaliadas as velocidades de giro do rotor de 4, 5 e 6 kHz. A análise de RMN HR-MAS de ^1H (FIGURA 22, p. 61) permitiu observar que nas velocidades de giro do rotor de 4 a 6 kHz o perfil espectral foi mantido. Apesar de ter sido utilizado um espectrômetro de RMN de 9,4 T observando o núcleo de ^1H a 400 MHz, a mínima velocidade de giro do rotor adequada para deslocar as bandas laterais de giro para fora da janela espectral em 10 ppm seria de 4 kHz. Nesse trabalho foi utilizado 5 kHz em que as condições da matriz são preservadas.

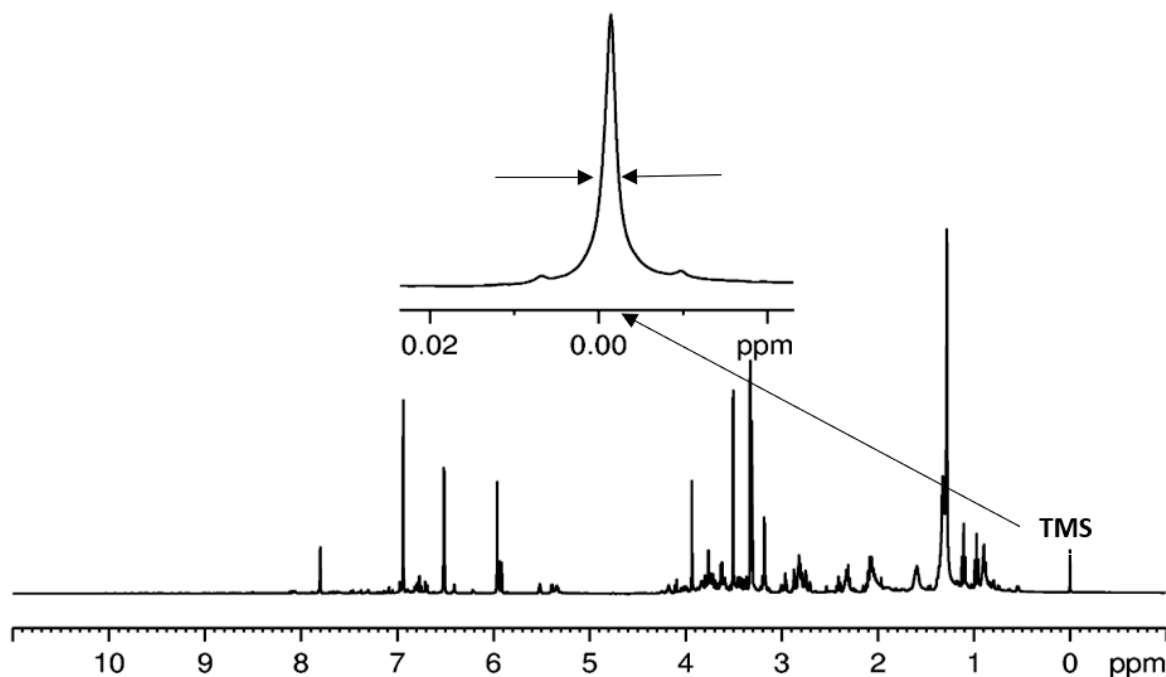
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') ADQUIRIDOS COM VELOCIDADES VARIÁVEIS DE GIRO DO ROTOR.



4.2.4 Ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*)

Em análises de RMN HR-MAS também é necessário garantir a homogeneidade do campo magnético (*shimming*). De acordo com Piotto et al. (2005), o rotor (porta-amostra) está susceptível a perturbações magnéticas externas ao rotor e da interface rotor/amostra que afetam a resolução em RMN-HR-MAS. Segundo os autores, deve-se garantir que o posicionamento do rotor na sonda e o volume de solvente seja o mesmo. Diante dessas considerações, a qualidade do *shimming* nas análises foi monitorada através da largura a meia altura do sinal do TMS que assumiu valores menores que 1 Hz em todos os espectros (FIGURA 23, p. 62).

FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DE CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') AVALIANDO O SHIMMING ATRAVÉS DO SINAL DO TMS (δ 0,00)



4.3 PERFIL ESPECTRAL DAS FOLHAS FRESCAS E DO CHÁ VERDE DAS CULTIVARES (*C. sinensis* 'Yabukita' E *C. sinensis* 'Yutakamidori')

O chá verde é um produto obtido a partir do processamento das folhas frescas de *C. sinensis*. O processamento é considerado um dos principais fatores que contribuem para a qualidade do chá verde. De acordo com Ahmed e Steep (2013), o processamento do chá verde é dividido em quatro principais etapas: colheita das folhas jovens, vaporização ou tratamento a calor seco, rolagem e secagem. O processamento reduz o sabor amargo, e desativa as enzimas polifenoloxidase e peroxidase, evitando a degradação dos metabólitos após a colheita.

A análise dos perfis espectrais obtido por RMN HR-MAS de ^1H das folhas frescas e dos chás verdes das cultivares de *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' permitiu observar que a composição química após o processamento foi mantida em ambas as cultivares. Além disso, pôde-se verificar que a intensidade dos metabólitos nas folhas frescas foi maior que nos chás verdes, evidenciando que o processamento utilizado mantém a composição química. No entanto, diminui a intensidade dos sinais (FIGURAS 24 e 25, p. 64).

Dessa forma, pôde-se verificar que o processamento contribui para a obtenção do chá verde de boa qualidade, pois preserva os metabólitos responsáveis pelo sabor, aroma, bem como, aqueles responsáveis pelas propriedades biológicas.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS FOLHAS FRESCAS E DO CHÁ VERDE DE *C. sinensis* 'Yabukita'.

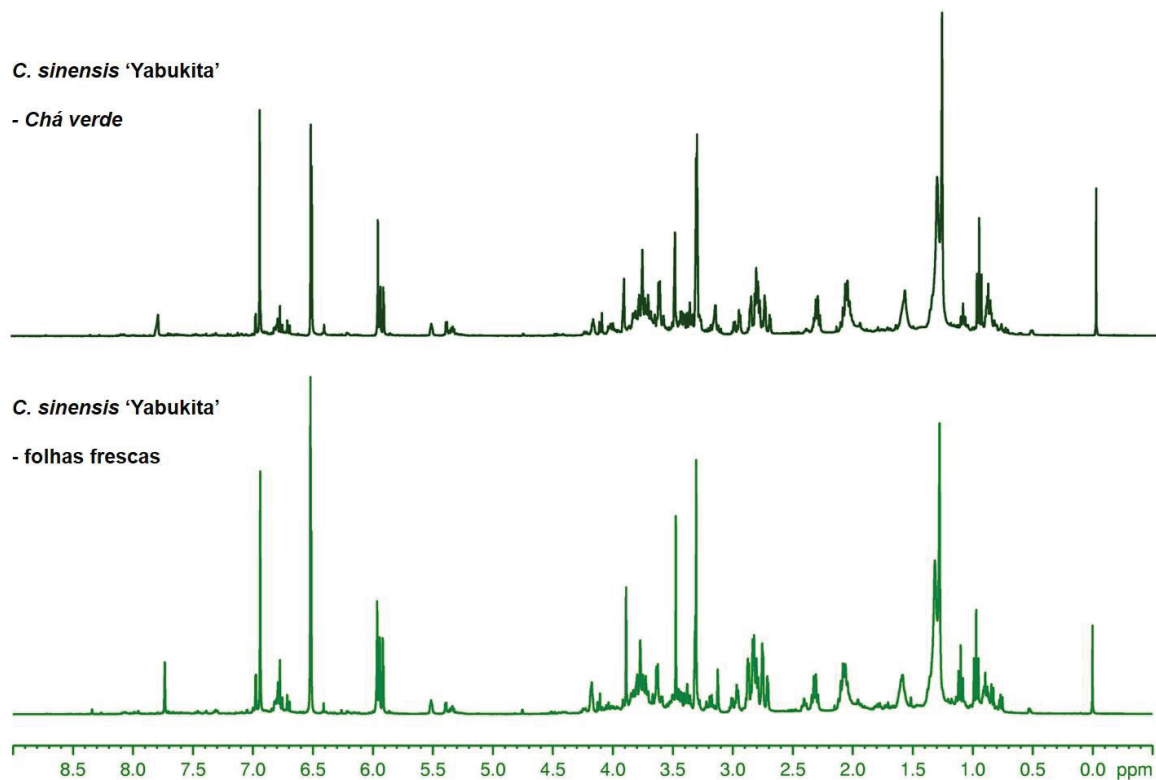
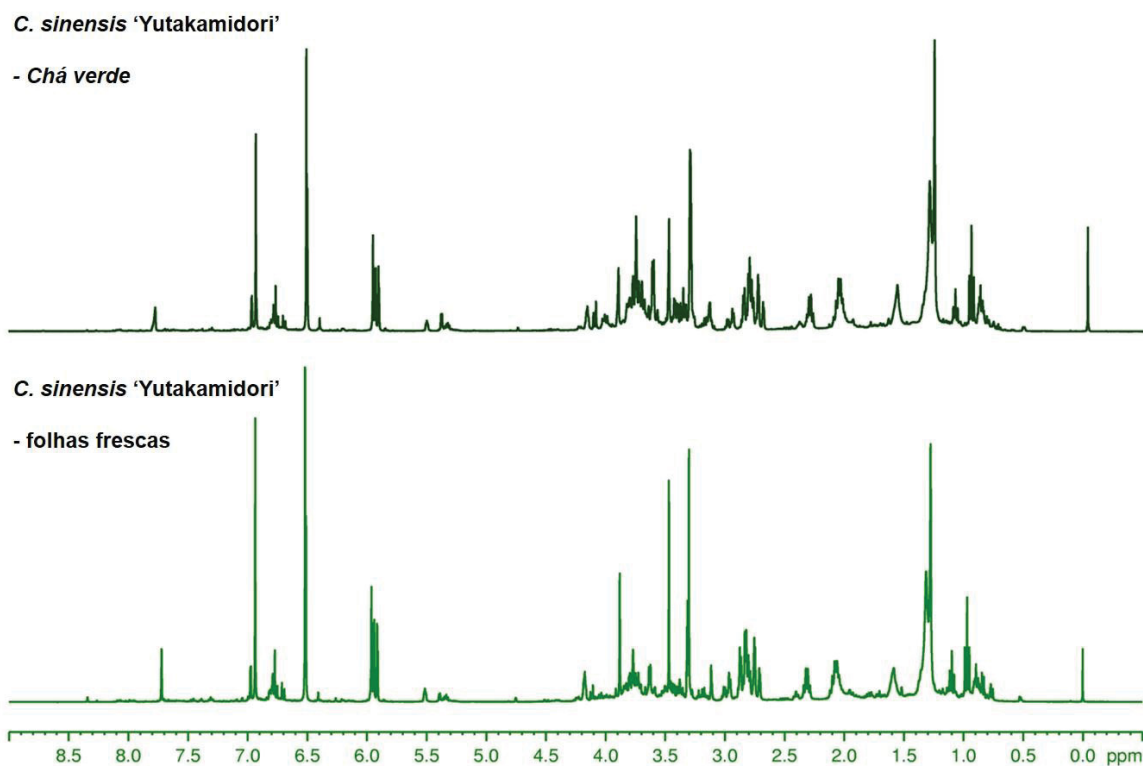


FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS FOLHAS FRESCAS E DO CHÁ VERDE DA *C. sinensis* 'Yutakamidori'.



4.4 PERFIL METABÓLICO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES DE *C. sinensis* 'Yabukita' E *C. sinensis* 'Yutakamidori'

Os perfis metabólicos de RMN HR-MAS de ^1H dos chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' são apresentados nas FIGURAS 26 e 27 (p. 66). Através da inspeção visual dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , observou-se similaridades nos perfis metabólicos entre as duas cultivares de chá verde ao longo da safra. A composição química constitui-se de ácidos graxos, aminoácidos, açúcares, catequinas e cafeína. Sendo assim, a identificação estrutural dos principais metabólitos foi realizada usando os dados de RMN HR-MAS de ^1H da cultivar *C. sinensis* 'Yabukita' e, podem ser estendidas a cultivar *C. sinensis* 'Yutakamidori' (FIGURA 26, p. 66).

FIGURA 26 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DURANTE OS MESES DA SAFRA DO CHÁ VERDE (OUT/2016 A ABRIL/2017) DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita'.

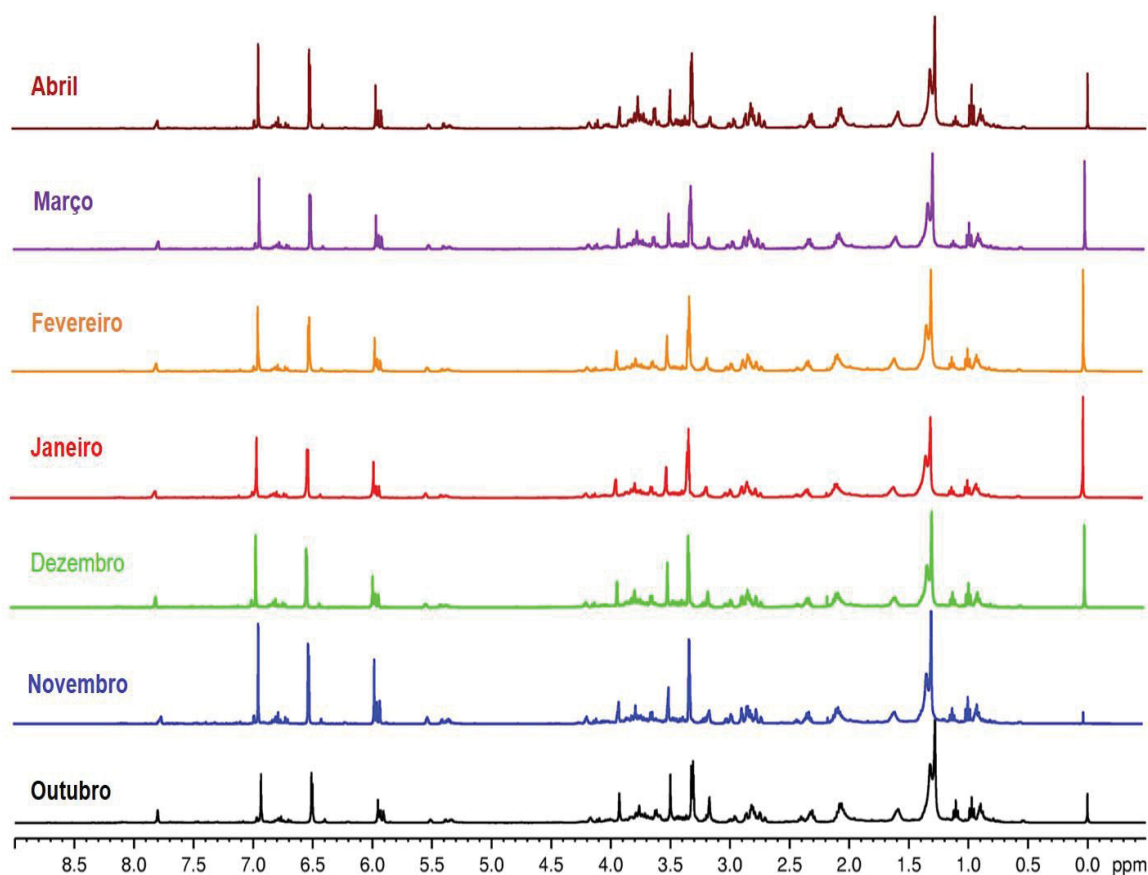
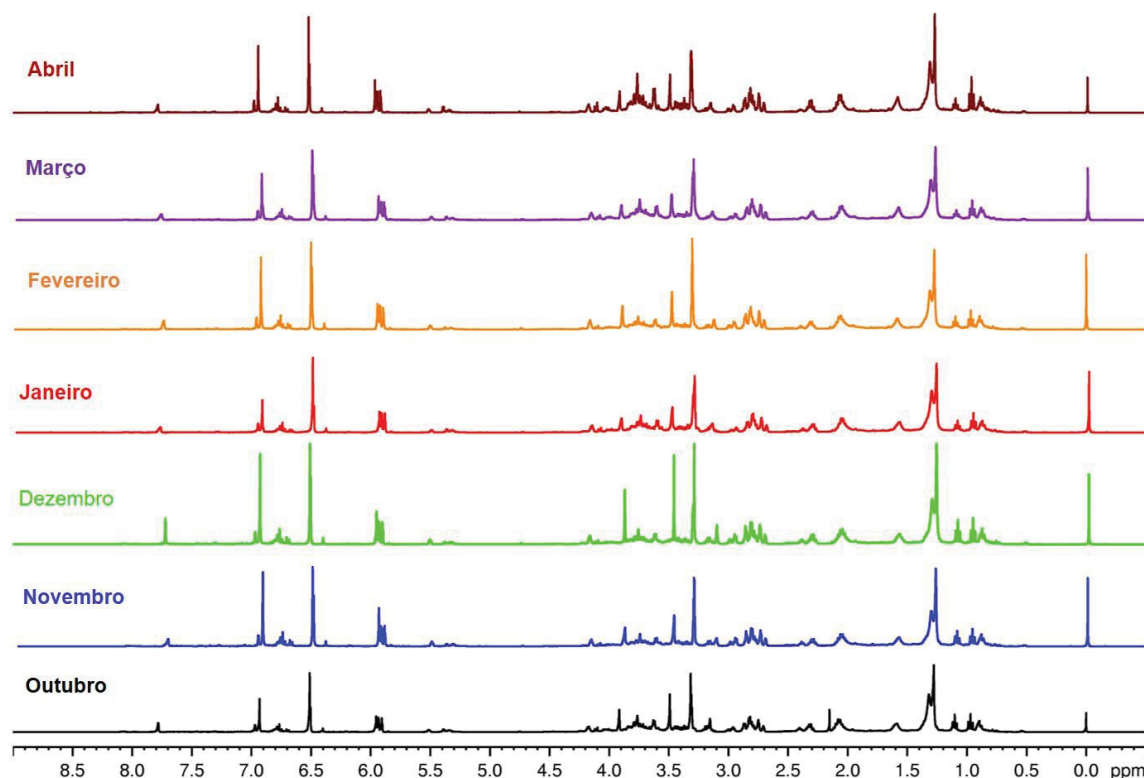


FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DURANTE OS MESES DA SAFRA DO CHÁ VERDE (OUT/2016 A ABRIL/2017) DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yutakamidori'.



A análise do espectro de RMN HR-MAS de ^1H das cultivares de chá verde (FIGURAS 28, 29 e 30, p. 68) permitiu observar a presença de sinais em δ_{H} 0,88, 1,28, 1,32 e 1,60 que foram atribuídos aos ácidos graxos de cadeia longa comumente encontrados no chá verde. Dentre os ácidos graxos de cadeia longa, pôde-se observar um tripleto em δ_{H} 0,97 (3H, $J = 7,5$ Hz) característico do ácido linolênico (FIGURAS 28 e 29, p. 68) (ALAMSJAH et al., 2005).

Além disso, foi possível observar um tripleto em δ_{H} 1,11 (3H, $J = 7,3$ Hz) característico do aminoácido teanina, bem como, quatro simpletos característicos da cafeína, sendo três deles atribuídos aos grupos metila (δ_{H} 3,32, 3,50 e 3,93), e um simpleto em δ_{H} 7,78 (1H, H-8) relativo ao hidrogênio aromático da cafeína (FIGURAS 28 e 29, p. 68) (LE GALL et al., 2004).

A análise da região aromática e de olefinas dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H (FIGURAS 28 e 29, p. 68; FIGURA 31, p. 70) revelou a presença de sinais característicos de flavan-3-óis também conhecidos como catequinas. Os flavan-3-óis são considerados os principais compostos químicos do chá verde (KELLOG et al., 2017). Os flavan-3-óis ou catequinas identificados no chá verde

foram: (-)-galato de *epi*-galocatequina (EGCG) (**6**), (-)-*epi*-galocatequina (EGC) (**7**), (-)-galato de *epi*-catequina (ECG) (**8**), e (-)-*epi*-catequina (EC) (**9**) (FIGURA 31, p. 70) (NOMIZU et al., 2008; USMAN et al., 2016).

Analisando-se o espectro de RMN HR-MAS de ^1H (FIGURAS 28 e 29, p. 68), foi observado um simpleto em δ_{H} 6,50 relativo aos hidrogênios em H-2' e H-6' localizados no anel B e outro simpleto em δ_{H} 6,94 atribuído aos hidrogênios em H-2'' e H-6'' localizado na unidade galoil do composto (-)-galato de *epi*-galocatequina (**6**). Verificou-se também um simpleto em δ_{H} 6,51 atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel C composto (-)-*epi*-galocatequina (**7**).

Também foram observados sinais de hidrogênios em δ_{H} 6,92 (*d*, $J = 2,0$ Hz), 6,69 (*d*, $J = 8,0$ Hz) e 6,80 (*dd*, $J = 8,0$ e 2,0 Hz) característicos dos hidrogênios em H-2', H-5' e H-6' do anel C do (-)-galato de *epi*-catequina (**8**) (FIGURAS 28 e 29, p.68)

Através do espectro de RMN HR-MAS de ^1H foram observados sinais em δ_{H} 6,92 (*d*, $J = 2,0$ Hz), 6,69 (*d*, $J = 8,0$ Hz) e 6,80 (*dd*, $J = 8,0$ e 2,0) relativos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel C da galato de *epi*-catequina (ECG) (**8**), respectivamente. Por outro lado, foram observados sinais em δ_{H} 6,97 (*d*, $J = 1,8$ Hz), 6,79 (*dd*, $J = 8,2$ e 1,8 Hz) e 6,75 (*d*, $J = 8,2$ Hz) típicos do anel C do anel trissubstituído da (-)-*epi*-catequina (**9**) (FIGURAS 28 e 29, p.68).

Para apoiar a identificação estrutural realizada através do espectro de RMN HR-MAS de ^1H , foi feita a confirmação das atribuições por meio dos experimentos de RMN bidimensionais em solução (HSQC e HMBC) (item 4.5, p. 71).

FIGURA 28 - AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DA REGIÃO ENTRE δ 4,50-0,50 DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita' AO LONGO DA SAFRA (OUT/2016 A ABRIL/2017).

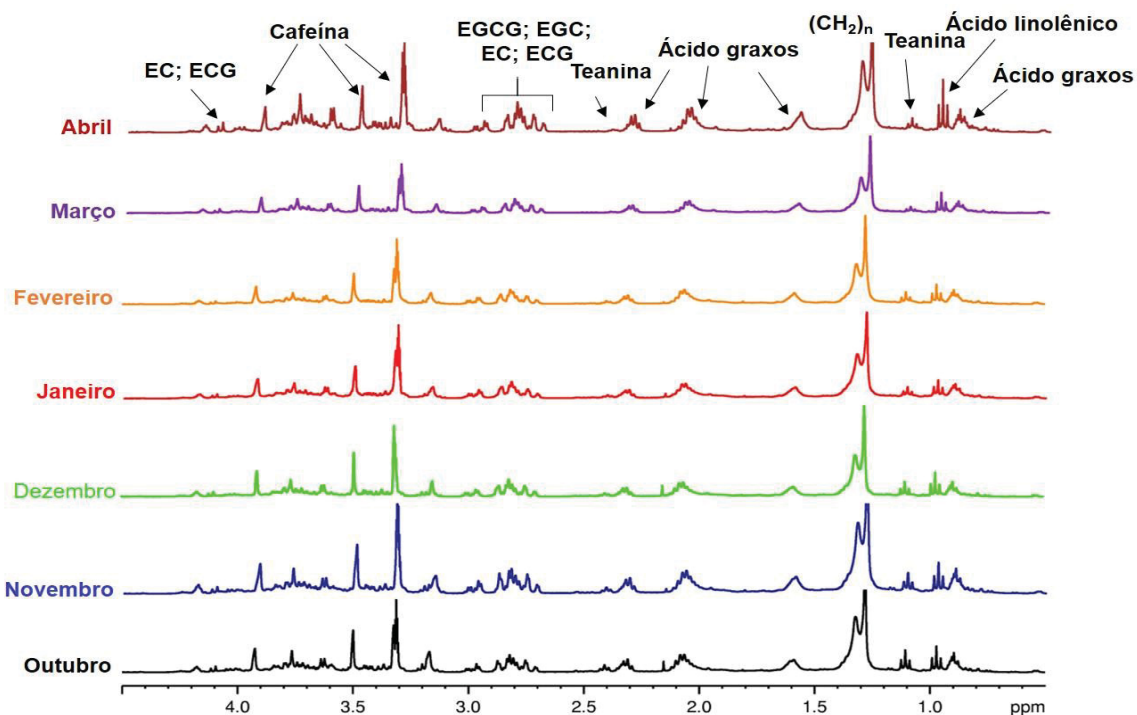


FIGURA 29 - AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DA REGIÃO ENTRE δ 8,00-5,40 DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita' AO LONGO DO PERÍODO DA SAFRA (OUT/2016 A ABRIL/2017).

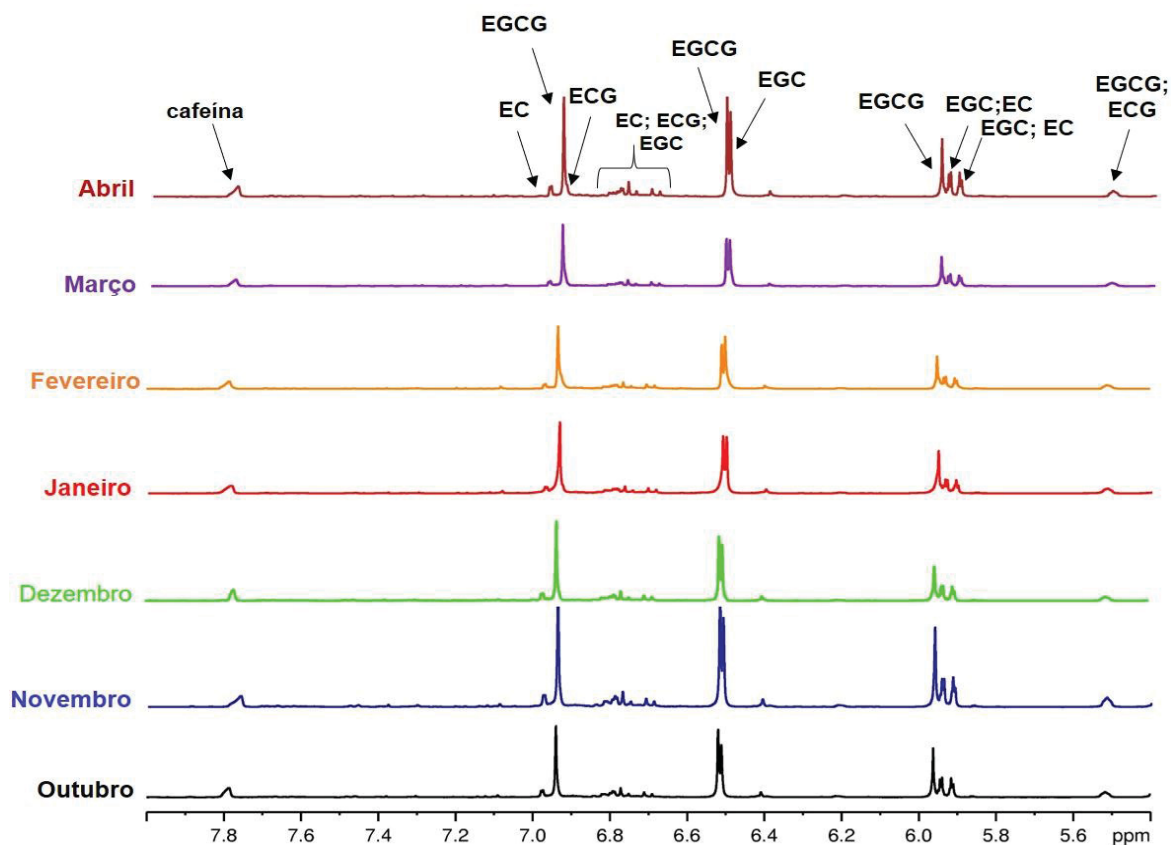


FIGURA 30 - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO CHÁ VERDE DAS CULTIVARES (*C. sinensis* 'Yabukita e *C. sinensis* 'Yutakamidori'). EM DESTAQUE OS SINAIS CARACTERÍSTICOS DESSES COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) REGIÃO ENTRE δ 5,45-0,90 PPM.

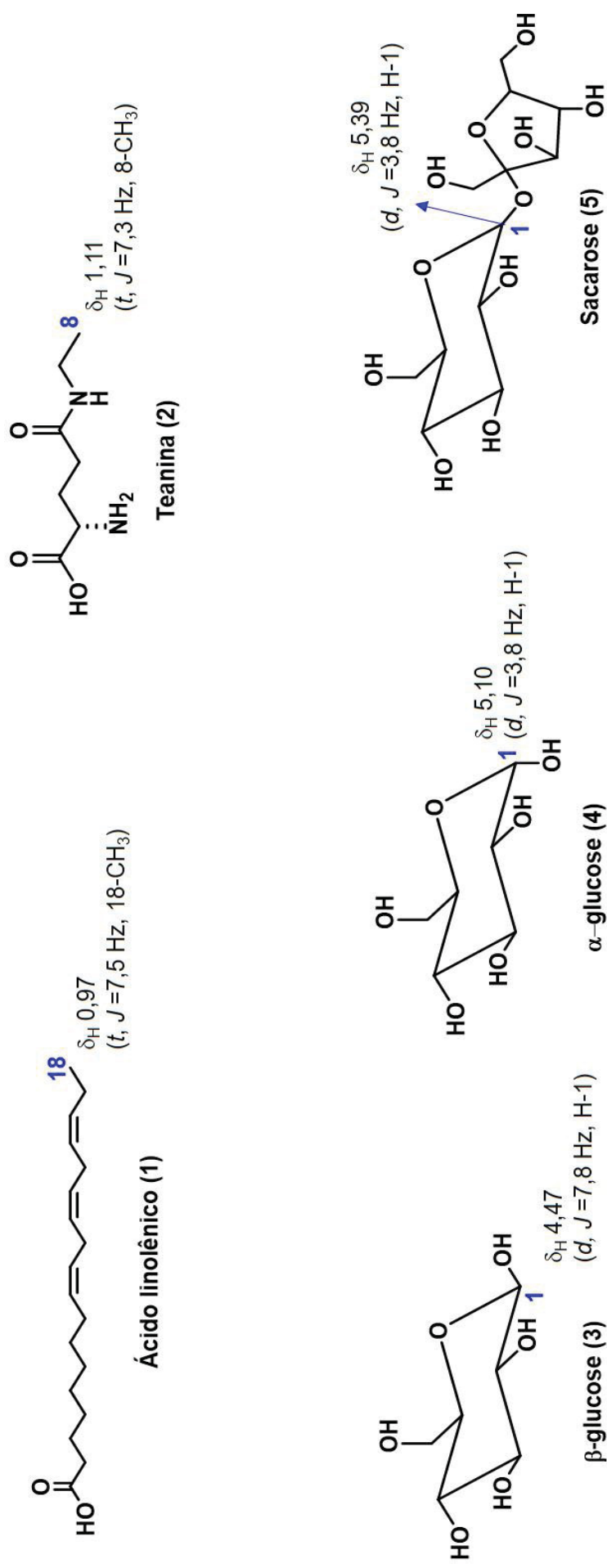
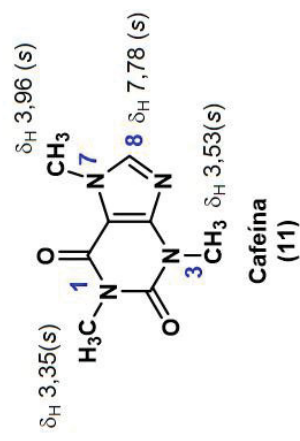
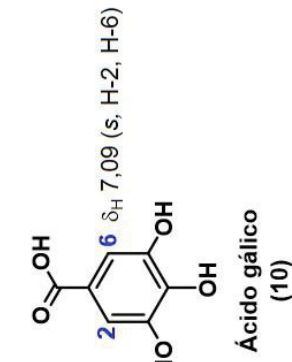
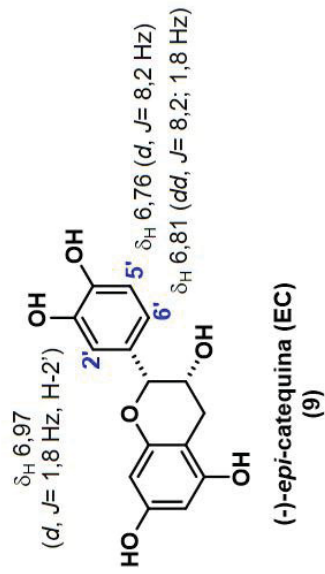
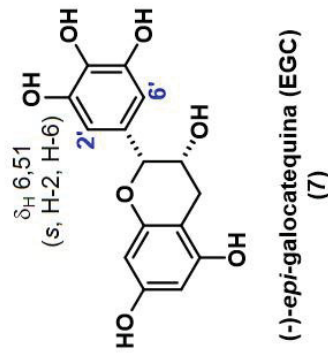
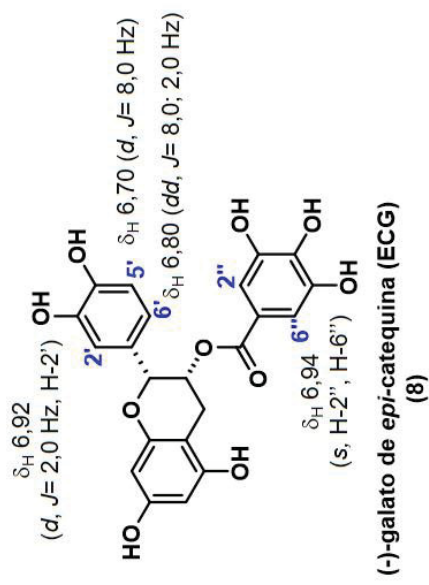
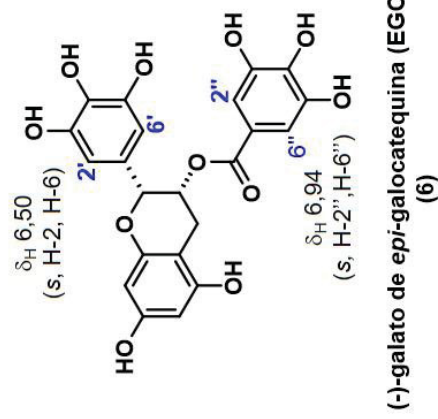


FIGURA 31 - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO CHÁ VERDE DAS CULTIVARES (C. sinensis 'Yabukita e C. sinensis 'Yutakamidori'). DESTAQUE OS PRINCIPAIS SINAIS CARACTERÍSTICOS DESSES COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) REGIÃO ENTRE δ 6,40 - 8,00 - 6,40 PPM.



4.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR RMN EM SOLUÇÃO

Os experimentos bidimensionais de RMN em solução foram adquiridos para os chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori'. De forma similar aos perfis espectrais desses chás obtidos por RMN HR-MAS de ^1H , o espectro de RMN de ^1H dos chás verdes de ambas as cultivares mostraram-se semelhantes (FIGURA 32). Diante disso, as discussões dos dados de RMN do chá verde da cultivar *C. sinensis* 'Yabukita' podem ser estendidas para o chá verde (*C. sinensis* 'Yutakamidori').

Os metabólitos identificados nos chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' através dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram confirmados com auxílio de experimentos bidimensionais obtidos por RMN em solução, a citar: mapas de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC (FIGURAS 33 e 34, p. 72).

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') (600 MHZ, CD_3OD).

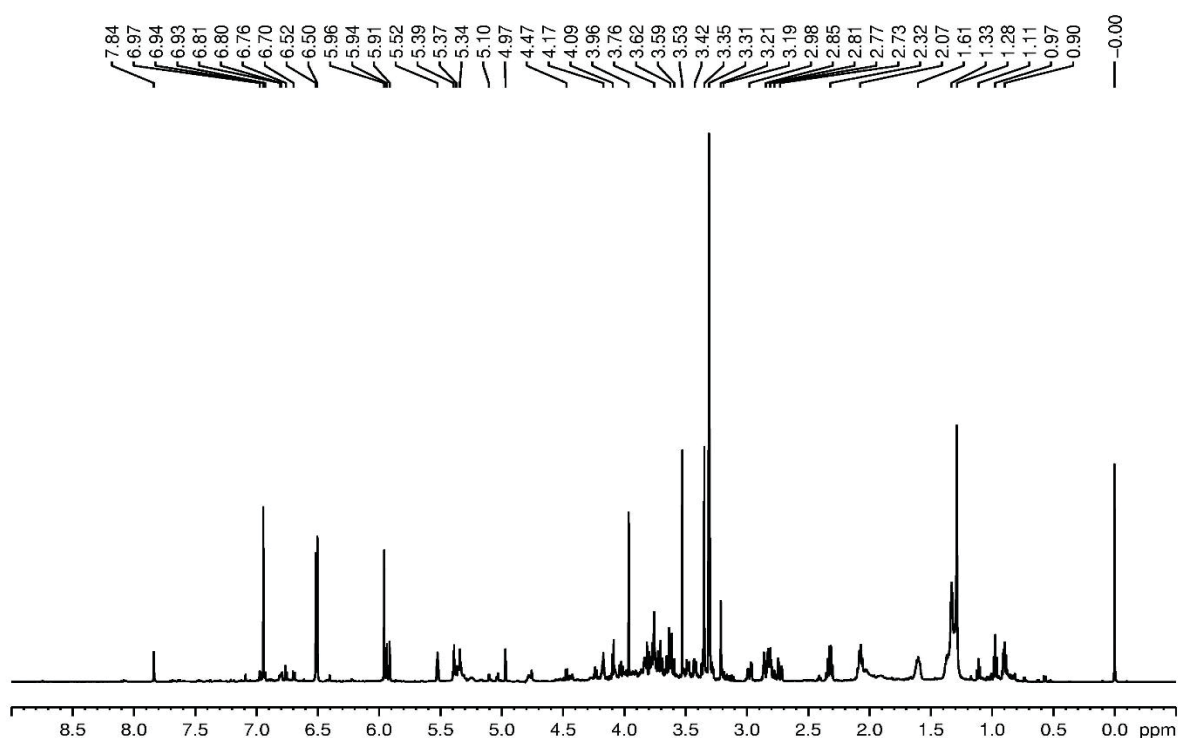


FIGURA 33 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita' (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD).

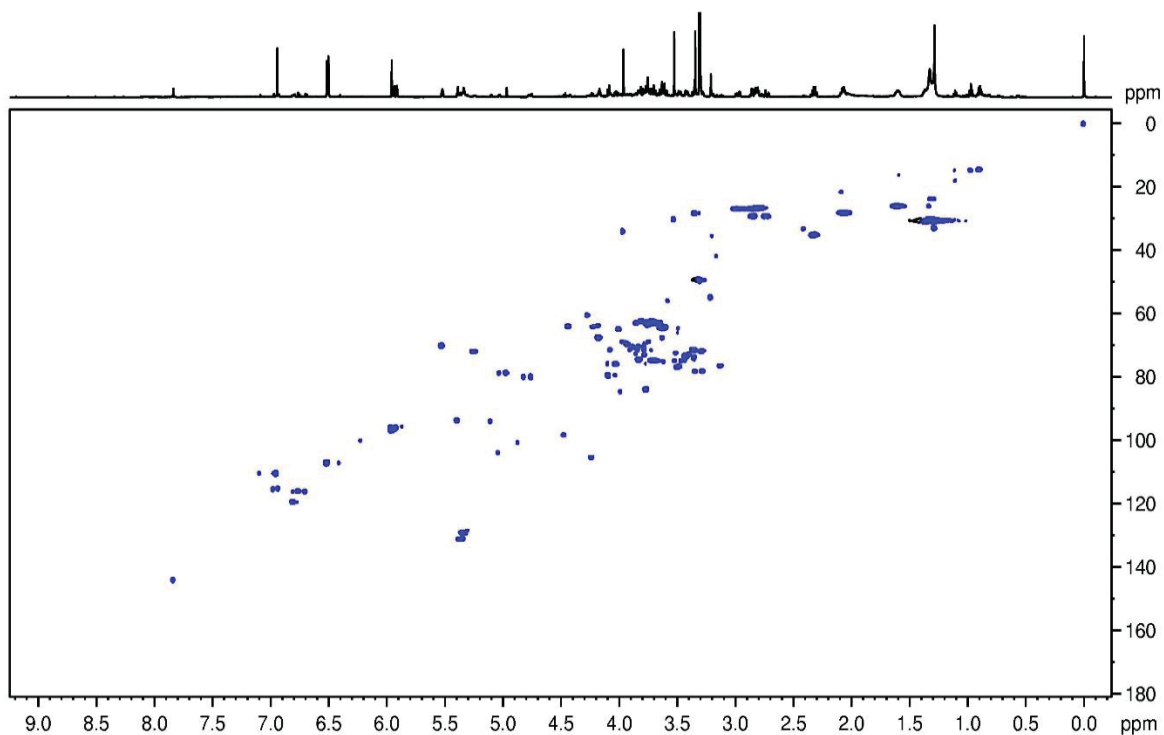
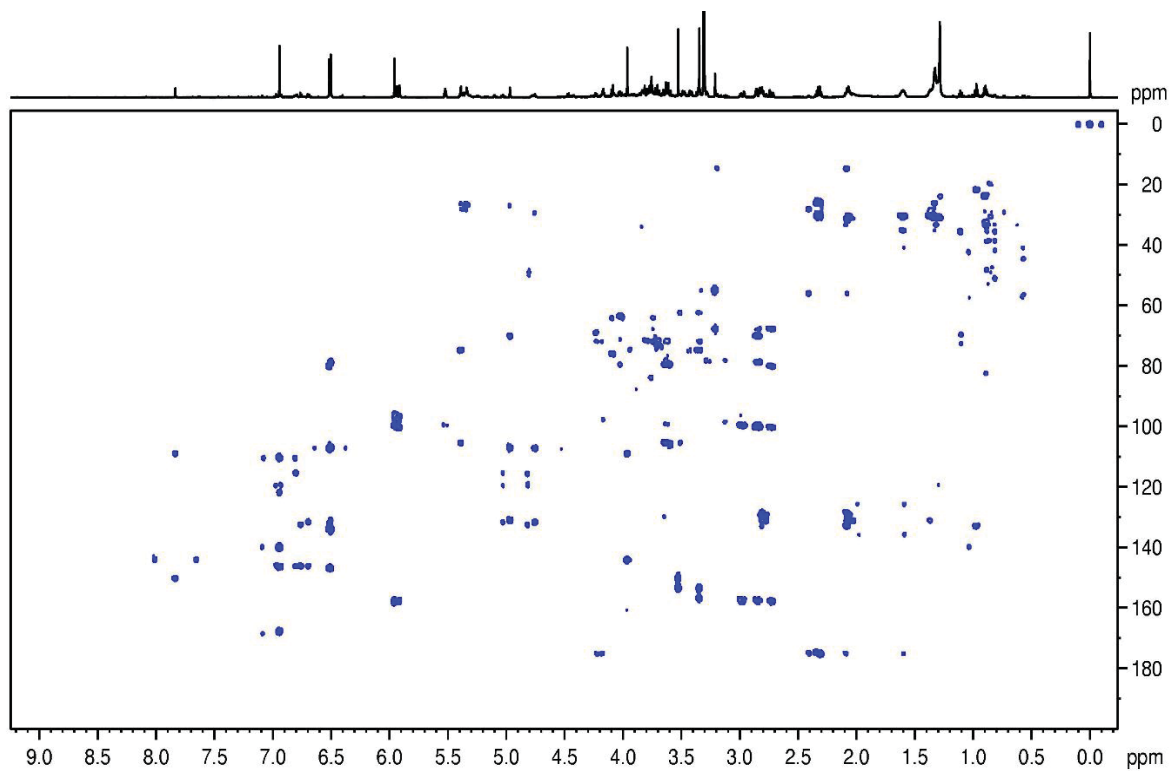


FIGURA 34 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita' (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD).



4.1.1 Identificação estrutural do ácido linolênico (1)

A análise de RMN de ^1H do chá verde (*C. sinensis* 'Yabukita) permitiu observar a presença de um tripleto em δ_{H} 0,97 (*t*, $J = 7,5$ Hz, H-18) que apresentou correlação direta no mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HSQC com o carbono em δ_{C} 14,7 (C-18), indicando um grupo metila (FIGURA 37, p. 76). A correta posição desse grupo foi estabelecida através do mapa de correlação a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC, no qual o sinal em δ_{H} 0,97 (*t*, $J = 7,5$ Hz) correlacionou a longa distância com os carbonos em δ_{C} 21,5 (C-17) e 132,7 (C-16).

Verificou-se também, através do mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC, a presença de um sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,31 (*t*, $J = 7,7$ Hz, H-2), que está ligado ao carbono em δ_{C} 35,1 (C-2). Além disso, pôde-se observar que o sinal em δ_{H} 2,31 correlacionou a longa distância com os carbonos em δ_{C} 30,1 (C-3) e 174,9 (C-1).

De acordo com os dados de RMN de ^1H , (^1H - ^{13}C) HSQC e (^1H - ^{13}C) HMBC e, em comparação com os disponíveis na literatura foi possível confirmar a presença do ácido linolênico em ambas as cultivares de chá verde (FIGURAS 37-39, p. 76 e 77 e TABELA 2, p. 74).

FIGURA 35 - ESTRUTURA DO ÁCIDO LINOLÊNICO

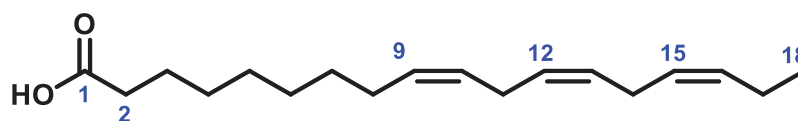


TABELA 2. DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DO ÁCIDO LINOLÊNICO.

Posição	Ácido linolênico			Ácido linolênico ALAMSJAH et al., 2005	
	δ_{H} mult., (J em Hz) ^a	δ_{C}	$^{\text{L-D}}J_{\text{H,C}}$ ^{a,b}	δ_{H} mult., (J em Hz) ^c	δ_{C} ^c
1		174,9			180,6
2	2,31 <i>t</i> (7,7)	35,1	1 e 3	2,35 <i>t</i> (7,2)	34,0
3	1,60 <i>m</i>	26,0			29,1
4	1,28-1,33 <i>m</i>	30,2			
5	2,07 <i>m</i>	28,0			
6					
7					
8	1,38 <i>m</i>				25,6
9				-	127,6
10	5,37 <i>m</i>	132,8			128,1
11					27,2
12	5,37 <i>m</i>	132,8		5,28-5,43 <i>m</i>	130,1
13					
14					29,9
15				5,28-5,43 <i>m</i>	128,2
16	5,37 <i>m</i>	132,8	17	5,28-5,43 <i>m</i>	131,9
17		21,5			20,6
18	0,97 <i>t</i> (7,5)	14,6	16 e 17	0,98 <i>t</i> (7,6)	14,3

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura ALAMSJAH et al., 2005 (400 MHz, CDCl_3).

4.1.2 Identificação estrutural da teanina (2)

A análise do espectro de RMN de ^1H do chá verde (*C. sinensis* 'Yabukita') permitiu observar a presença de um grupo etila na molécula devido aos sinais em δ_{H} 1,11 (3H, *t*, $J = 7,1$ Hz, H-8) e 3,19 (2H, *q*, $J = 7,1$ Hz, H-7). De acordo com o mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC (FIGURA 37, p. 76), esses sinais estão ligados aos carbonos em δ_{C} 14,6 (C-8) e 35,3 (C-7), respectivamente.

Através do mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HMBC foi observado que o tripleto em δ_{H} 1,11 (H-8) correlacionou a longa distância com o carbono em δ_{C} 35,3 (C-7) e, o sinal em δ_{H} 3,19 (H-7) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 14,6 (C-8) e 174,8 (C-5). Além disso, observou-se no espectro de RMN de ^1H sinais característicos dos hidrogênios metínicos em δ_{H} 3,58 (1H, *m*, H-2) e metilênicos em δ_{H} 2,11-2,04 (1H,

m, H-4) e 2,41 (2H, *t*, $J = 7,1$ Hz, H-3), que apresentaram correlação direta no mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HSQC (FIGURA 38, p. 76), com os carbonos δ 55,9 (C-2), 28,1 (C-3) e 33,1 (C-4), respectivamente.

A correta localização dos sinais assinalados foi estabelecida através do mapa de correlação ^1H - ^{13}C HMBC (FIGURA 39, p. 77). O sinal do hidrogênio em δ_{H} 2,41 (H-4) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 28,1 (C-4), 55,9 (C-2), e 174,9 (C-1), assim como, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 2,07 (H-4) correlacionou com os carbonos em δ 33,3 (C-3), 55,9 (C-2) e 174,9 (C-1).

De acordo com os dados de RMN de ^1H , (^1H - ^{13}C) HSQC e (^1H - ^{13}C) HMBC e, em comparação com os dados disponíveis na literatura, foi possível confirmar a presença do aminoácido teanina em ambas as cultivares de chá verde (FIGURAS 36, 37-39, p. 76 e 77 e TABELA 3).

FIGURA 36 - ESTRUTURA DA TEANINA

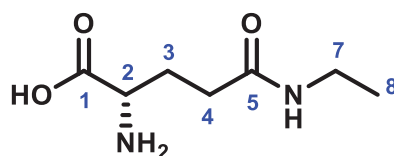


TABELA 3. DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA TEANINA

Posição	Teanina (experimental)			Teanina (SEBIH et al., 2017)	
	δ^1_{H} ; mult., (J em Hz) ^a	δ^{13}_{C} ^{a,b}	L-D $J_{\text{H,C}}$ ^{a,b}	δ^1_{H} ; mult., (J em Hz) ^c	δ^{13}_{C} ^c
1		174,9			174,29
2	3,59 <i>m</i>	55,9		3,76 <i>t</i> (8,0).	53,56
3	2,11 <i>m</i>	28,1	1, 2 e 4	2,13 <i>dd</i> (8,0 e 6,5)	26,53
4	2,41 <i>t</i> (7,1)	33,1	2, 3 e 5	2,4 <i>td</i> (8,0 e 4,2)	31,73
5		171,8			173,95
7	3,19 <i>q</i> (7,1)	35,3	8	3,2 <i>q</i> (7,75)	34,57
8	1,11 <i>t</i> (7,3)	14,6	7	1,10 <i>t</i> (7,75)	13,41

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura SEBIH et al., 2017 (^1H : 300 MHz e ^{13}C , 75 MHz, D_2O). (δ) Deslocamento químico em ppm.

FIGURA 37 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,15 – 0,93 DO ESPECTRO DE RMN EM SOLUÇÃO DE ^1H DO CHÁ VERDE (600 MHz, CD_3OD).

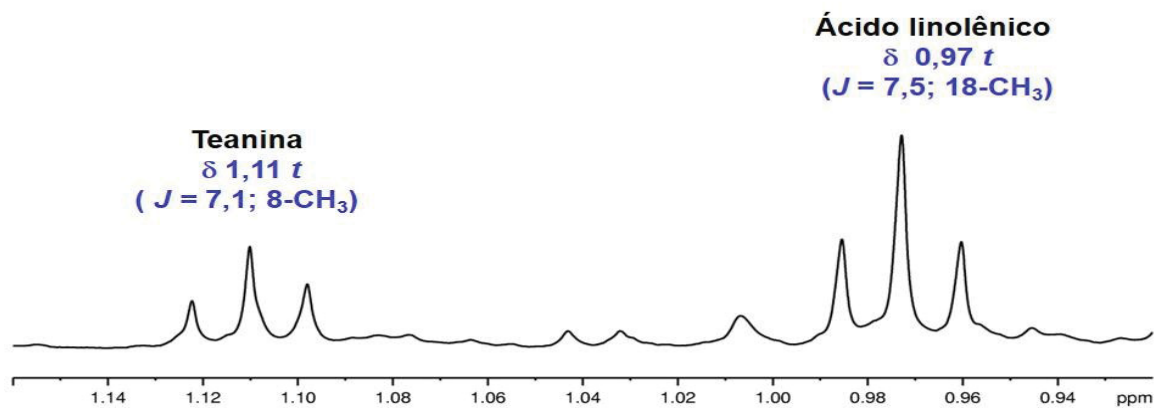


FIGURA 38 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,15 - 0,95 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA HSQC (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE.

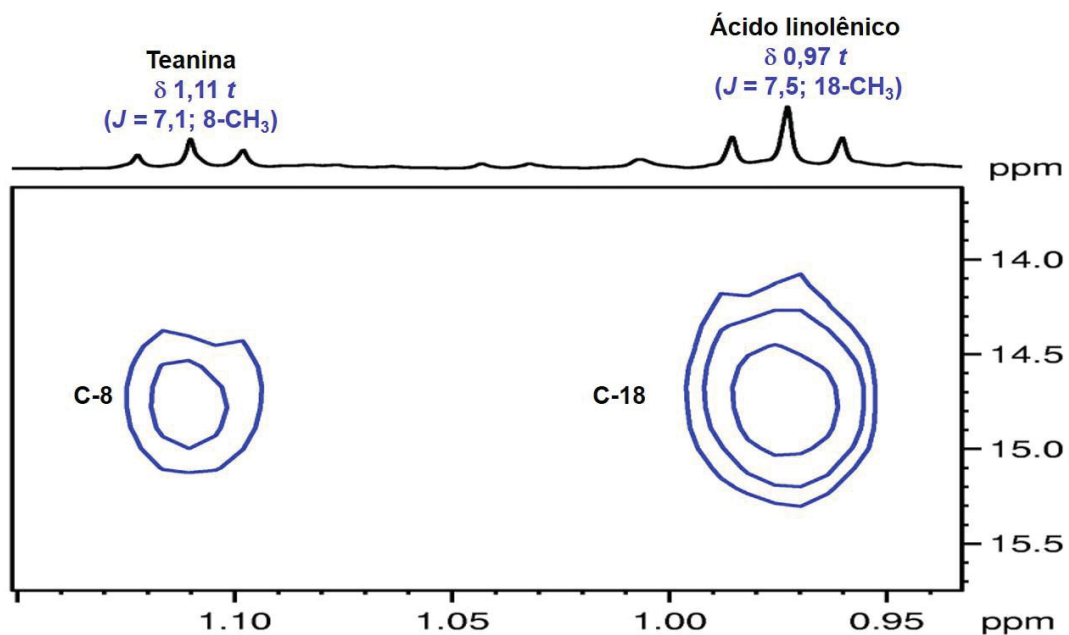
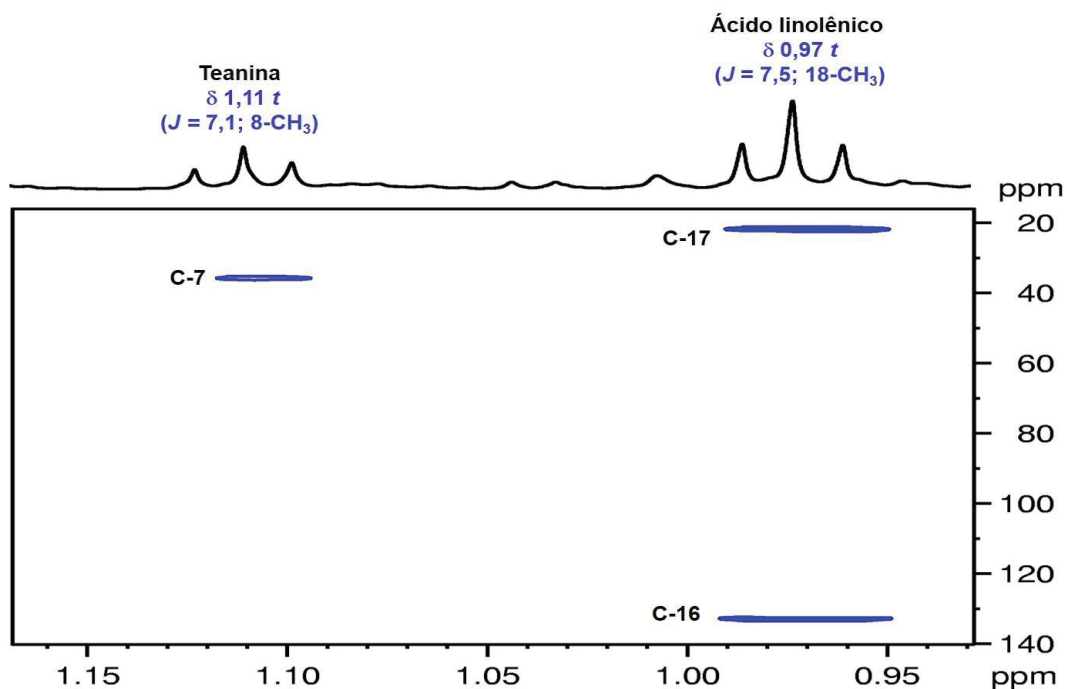


FIGURA 39 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,15-0,95 DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA HMBC (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE.



4.1.3 Identificação estrutural dos açúcares (4, 5 e 6)

Analisando a região entre δ_H 5,50-4,45 do espectro de RMN de 1H do chá verde (*C. sinensis* 'Yabukita') foram observados três dupletos em δ_H 5,39 ($J = 3,8$ Hz), 5,10 ($J = 3,8$ Hz) e 4,47 ($J = 7,8$ Hz) relativos aos hidrogênios anoméricos (H-1) dos açúcares sacarose, α -glucose e β -glucose (TSUJIMOTO et al., 2019). Estes sinais apresentaram correlação direta no mapa de correlação (1H - ^{13}C) HSQC com os carbonos em δ_c 93,7, 93,9 e 98,2, respectivamente (TSUJIMOTO et al., 2019) (FIGURAS 40 e 41, p. 79).

A magnitude da constante de acoplamento (3J) é dependente do ângulo diedro entre os dois hidrogênios que estão interagindo e, juntamente com o deslocamento químico, auxiliam na identificação das características estruturais do composto. Na glucose, o hidrogênio ligado ao carbono anomérico está acoplado ao hidrogênio ligado ao C-2, que resulta em um duplete. Como pôde ser observado, a constante de acoplamento do anômero α da glucose é menor que a do anômero β .

A constante de acoplamento do anômero α é $J = 3,8$ Hz, o que é consistente com o menor ângulo diedro axial-equatorial em H-C₁-C₂-H, que é de aproximadamente 60°. Por outro lado, o anômero β apresenta uma maior constante de acoplamento ($J = 7,8$ Hz), que é consistente com o maior acoplamento do hidrogênio axial-axial desse anômero, no qual o ângulo diedro H-C₁-C₂-H é aproximadamente 180° (GURST, 1991; PERIYANNAN et al., 2015).

De acordo com os dados de RMN de 1H e o mapa de correlação direta, bem como os dados da literatura, foram identificados a α -glucose, β -glucose e a sacarose nas amostras de chá verde (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori') (FIGURAS 40-42 e TABELAS 4, 5 e 6, p. 80 e 81).

FIGURA 40 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 5,50-4,45 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') (600 MHz, CD_3OD). (3) β -GLUCOSE (4) α -GLUCOSE, (5) SACAROSE.

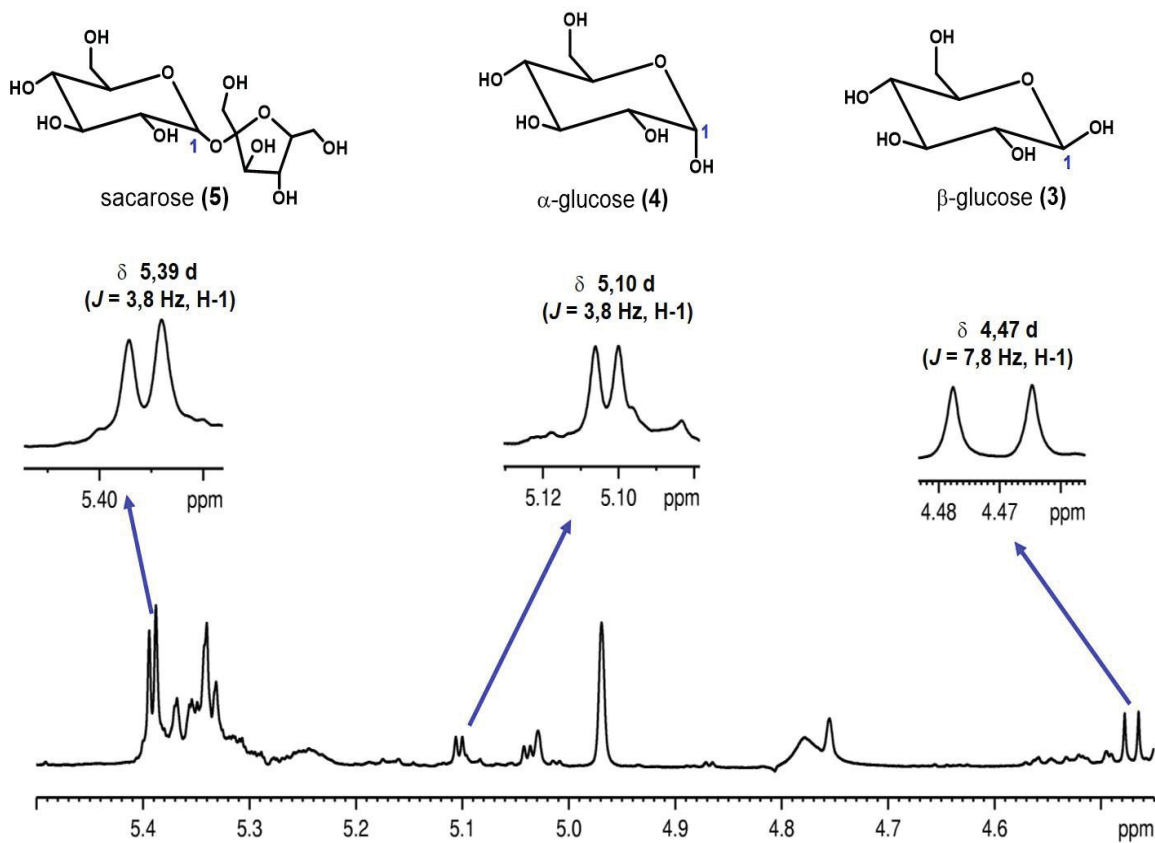


FIGURA 41 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC DO CHÁ VERDE DA CULTIVAR *C. sinensis* 'Yabukita' (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD). (4) β -GLUCOSE, (5) α -GLUCOSE E (6) SACAROSE.

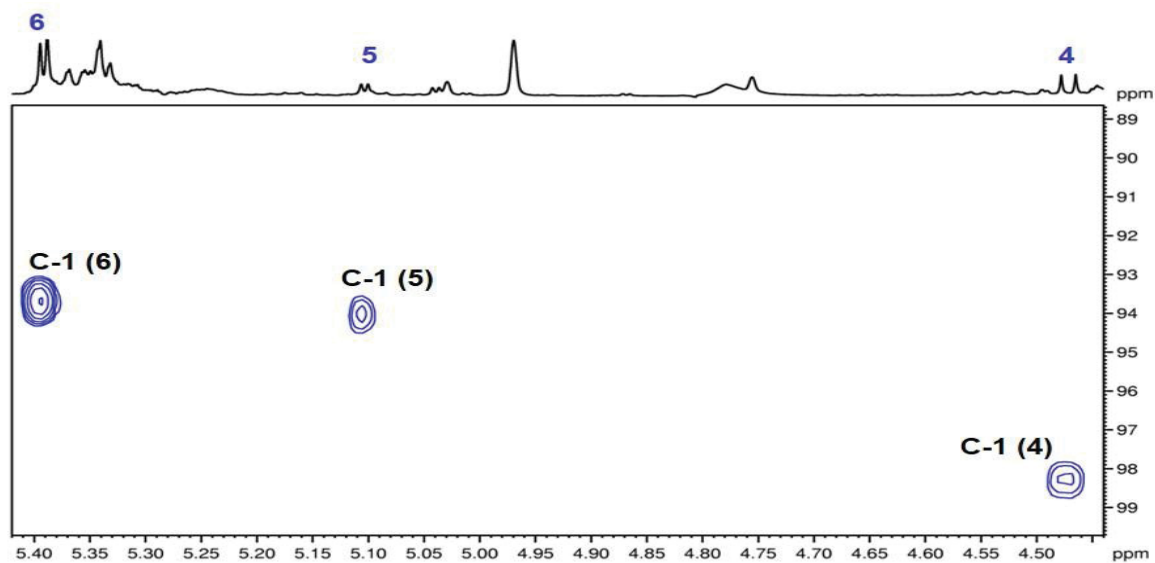


FIGURA 42 - ESTRUTURA DA β -GLUCOSE.

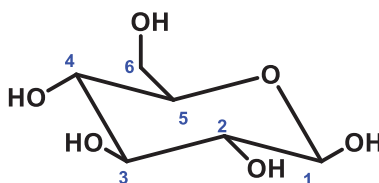


TABELA 4 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA β -GLUCOSE

Posição	β -Glucose (experimental)		β -Glucose (TSUJIMOTO et al., 2015)	
	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^a	$\delta^{13}\text{C}$ ^{a,b}	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^c	$\delta^{13}\text{C}$ ^c
1	4,47 <i>d</i> (7,8)	98,2	4,45 <i>d</i> (7,8)	99,99

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura TSUJIMOTO et al., 2019 (800 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

FIGURA 43 - ESTRUTURA DA α -GLUCOSE.

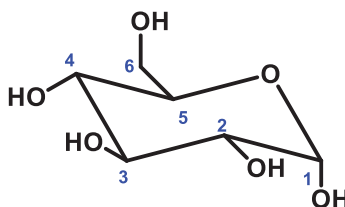


TABELA 5 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA α -GLUCOSE.

Posição	α -Glucose (experimental)		α -Glucose (TSUJIMOTO et al., 2015)	
	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^a	$\delta^{13}\text{C}$ ^{a,b}	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^c	$\delta^{13}\text{C}$ ^c
1	5,10 <i>d</i> (3,8)	93,9	5,09 <i>d</i> (3,7)	95,73
2	3,36 <i>m</i>	74,7	3,34 <i>dd</i> (9,8 e 3,8).	74,72

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura TSUJIMOTO et al., 2019 (800 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

FIGURA 44 - ESTRUTURA DA SACAROSE.

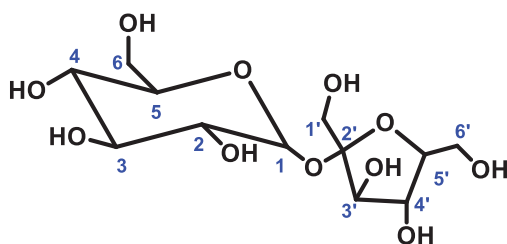


TABELA 6. DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA SACAROSE.

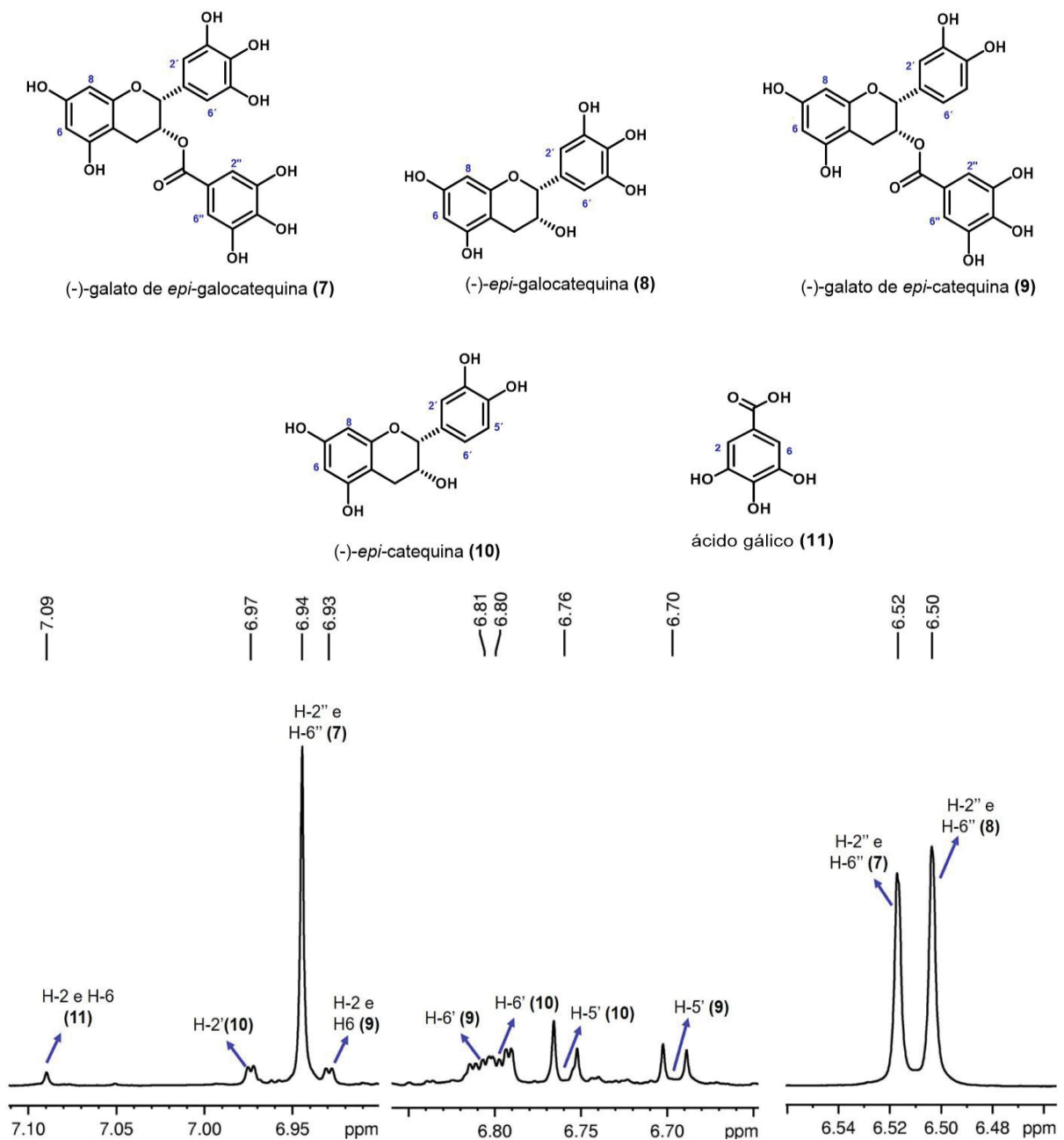
Posição	Sacarose (experimental)		Sacarose (TSUJIMOTO et al., 2015)	
	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^a	$\delta^{13}\text{C}$ ^{a,b}	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^c	$\delta^{13}\text{C}$ ^c
1	5,39 <i>d</i> (3,8)	93,7	5,37 <i>d</i> (3,8)	95,39
2	3,42 <i>dd</i> (9,8 e 3,8)	74,8	3,40 <i>t</i> (9,8 e 3,8)	74,98
3	-	-	3,68 <i>t</i> (9,6)	76,39
4	-	-	3,34 <i>t</i> (9,4)	73,04
5	-	-		76,15
6	3,70 <i>m</i>	62,5	3,70 <i>dd</i> (7,9 e 4,0)	63,91
1'	3,62 <i>d</i> (12,0)	64,2	3,62 <i>d</i> (12,3) 3,58 <i>d</i> (12,3)	65,75
2'	-	105,4		107,06
3'	4,08 <i>d</i> (8,3)	79,6	4,08 <i>d</i> (8,2)	80,99
4'	4,03 <i>m</i>	75,9	4,01 <i>t</i> (7,7)	77,40
5'	-	-		85,56
6'	3,75 <i>m</i>	63,5	3,79 <i>dd</i> (12,0 e 2,7)	65,75

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura TSUJIMOTO et al., 2019 (800 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

4.1.4 Identificação estrutural dos flavanóis e do ácido gálico (6-10)

Através da análise do espectro de RMN HR-MAS de ^1H do chá verde foi possível observar sinais típicos dos flavanóis e do ácido gálico (FIGURA 45). Os flavanóis identificados foram (-)-galato de *epi*-galocatequina, (-)-*epi*-galocatequina, (-)-galato de *epi*-catequina e (-)-*epi*-catequina, os quais foram confirmados a partir dos experimentos de RMN 2D em solução que serão discutidos a seguir.

FIGURA 45 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ_{H} 7,10-6,47 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') (600 MHz, CD_3OD).



4.1.5 Identificação estrutural da (-)-galato de *epi*-galocatequina (EGCG) (6)

A análise do espectro de RMN de ^1H do chá verde da cultivar permitiu observar um simpleto em δ_{H} 5,95, típico do anel A do flavanol. No mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC foi observado que o sinal δ_{H} 5,95 está ligado aos carbonos em δ_{C} 96,5 (C-6) e 95,9 (C-8).

A correta localização desse simpleto foi confirmada através do mapa de correlação a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC. Neste, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 5,95 (s) apresentou correlações com os carbonos em δ_{C} 95,9 (C-8), 96,5 (C-6), 99,5 (C-4a), 157,8 (C-7 e C-8), e 157,5 (C-8a). Com isso, foi estabelecido que o simpleto em δ 5,95 refere-se aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel aromático 1,2,3,5-tetrasubstituído (anel A dos flavonóides).

Pôde-se observar também sinais dos hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,85 (*dd*, $J = 17,4$ e $4,7$ Hz, H-4 *pseudo*-axial) e 2,98 (*dd*, $J = 17,4$ e $4,7$ Hz, H-4 *pseudo*-equatorial). Esses hidrogênios apresentaram correlação direta no mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HSQC com o carbono em δ_{C} 26,8 (C-4). O sinal do hidrogênio em δ_{H} 2,98 (H-4 *pseudo*-equatorial) apresentou correlação a longa distância com os carbonos em δ_{C} 99,5 (C-4a), 157,5 (C-8a) e 157,8 (C-5 e C-8), assim como, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 2,85 (H-4 *pseudo*-axial) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 70,0 (C-3), 78,7 (C-2), 99,5 (C-4a), 157,8 (C-5) e 157,5 (C-8a), sugerindo a presença de um anel heterocíclico tetrasubstituído (anel C dos flavanóis).

O mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC evidenciou que o hidrogênio em δ_{H} 4,97 (*m*, H-2) está ligado ao carbono em δ_{C} 78,7 (C-2) indicando a presença de um carbono oximetínico na molécula. De acordo com as correlações a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,97 (*m*, H-2) apresenta correlações com os carbonos em δ_{C} 26,8 (C-4), 70,0 (C-3), 116,9 (C-3') e 130,7 (C-1') compatível com a presença de um anel aromático (anel B) ligado ao anel C do flavanol.

A presença do anel B foi confirmada através do mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC. Um simpleto em δ_{H} 6,50 foi assinalado para os hidrogênios H-2' e H-6', que estão ligados ao carbono em δ_{C} 106,9 (C-2' e C-6'). O simpleto em δ_{H} 6,50 apresentou correlações a longa distância no mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HMBC com os carbonos em δ_{C} 78,7 (C-2), 130,7 (C-1), bem como, com os carbonos em δ_{C} 133,7 (C-4') e 146,8 (C-3' e C-5') típicos de carbonos ligados aos grupos hidroxilas.

Por fim, observou-se que o sinal do hidrogênio em δ_H 6,94 (s), assinalado para os hidrogênios (H-2'' e H-6'') característico de um anel aromático 1,3,4,5-tetrasubstituído, apresentou correlação direta com o sinal do carbono em δ_C 110,3 (C-2'' e C-6''). A correta localização desse hidrogênio foi estabelecida através do mapa de correlação (1H - ^{13}C) HMBC, no qual o simpleto em δ_H 6,94 apresentou correlações a longa distância com os sinais dos carbonos em δ_C 121,6 (C-1''), 139,9 (C-4''), 146,3 (C-3'' e C-4'') e 167,7 (C=O) confirmando a presença da unidade galoila do flavanol.

Os dados de RMN de 1H , mapas de correlação direta (1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (1H - ^{13}C) HMBC, bem como, comparações com a literatura permitiram confirmar a presença do (-)-galato de *epi*-galocatequina (EGCC) (FIGURA 46) no chá verde de ambas as cultivares (FIGURAS 51 e 52, p. 93) e (TABELA 7, p. 85).

FIGURA 46 - ESTRUTURA DO (-)-GALATO DE *EPI*-GALOCATEQUINA (EGCG) (6).

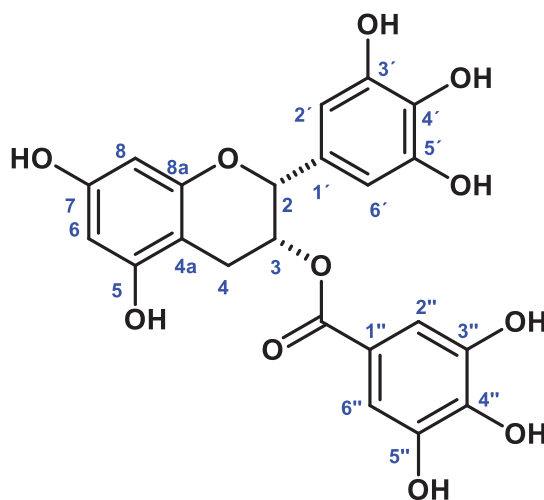


TABELA 7. DADOS DE RMN DE ¹H E ¹³C DA (-)-GALATO DE EPI-GALOCATEQUINA

Posição	(-)- galato de epi-galocatequina (experimental)			(-)-galato de epi-galocatequina (NOMIZU et al., 2008) ^b	
	δ ¹ H; mult., (J em Hz) ^a	δ ¹³ C ^{a,b}	L- ^D J _{H,C} ^{a,b}	δ ¹ H; mult., (J em Hz) ^c	δ ¹³ C ^c
2	4,96 <i>m</i>	78,7	1, 3, 4, 2' e 6'	4,96 <i>s</i>	78,6
3	N.O	N.O		5,20 <i>m</i>	70,0
4p_{ax}	2,85 <i>dd</i> (17,4 e 4,7)	26,8		2,84 <i>dd</i> (17,0 e 2,5)	26,8
4p_{eq}	2,98 <i>dd</i> (17,4 e 4,7)		2,97 <i>dd</i> (17,0 e 5,0)		
5 e 7		157,8		157,8	
6	5,95 <i>s</i>	96,5	5, 7 e 10	5,96 <i>s</i>	96,6
8	5,95 <i>s</i>	95,9		5,95 <i>s</i>	95,9
8a		157,5			157,2
4a		99,5			99,4
1'		130,7			130,8
2'e 6'	6,50 <i>s</i>	106,9	2, 3' e 4'	6,50 <i>s</i>	106,9
3'e 5'		146,8			146,7
4'		133,7			133,8
1''		121,6			121,5
2'' e 6''	6,94 <i>s</i>	110,3	1'',4'',3'',5''e CO	6,94 <i>s</i>	110,3
3'' e 5''		146,3			146,2
4''		139,9			140,0
C=O		167,7			167,7

^a Experimento realizado a 600MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C em CD₃OD. Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura NOMIZU et al., 2008 (¹H, 500 MHz e ¹³C, 125 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm. N.O = não observado

4.1.6 Identificação estrutural da (-)-*epi*-galocatequina (EGC) (7)

A análise do espectro de RMN de ^1H do chá verde permitiu observar a presença de um composto bastante similar ao (-)-galato de *epi*-galocatequina. A principal diferença consistiu na ausência da unidade galoila ligada ao carbono (C-3). Pôde-se observar a presença de um simpleto em δ_{H} 6,51 que apresentou correlação direta com o sinal do carbono em δ_{C} 107,0 (C-2' e C-6').

Além disso, foi observado que o sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,74 (*m*) estava correlacionado diretamente com o carbono em δ_{C} 79,9 (C-2), e apresentava correlação a longa distância no mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HMBC com os carbonos em δ_{C} 107,0 (C-2' e C-6'') e 131,6 (C-1'), indicando que o anel C está ligado ao anel B do flavanol.

De acordo com o mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HMBC a longa distância, observou-se que o sinal do hidrogênio em δ_{H} 6,51 apresentou correlação com os carbonos em δ_{C} 79,9 (C-2), 133,8 (C-4') e 146,8 (C-3' e C-5') confirmando a presença do anel C do flavanol.

Os dados de RMN de ^1H , mapas de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC, bem como, comparações com a literatura permitiram confirmar a presença da (-)-*epi*-galocatequina (EGC) (FIGURA 47) no chá verde de ambas as cultivares (FIGURAS 51 e 52, p. 94 e TABELA 8, p. 87).

FIGURA 47 - ESTRUTURA DA (-)-EPI-GALOCATEQUINA.

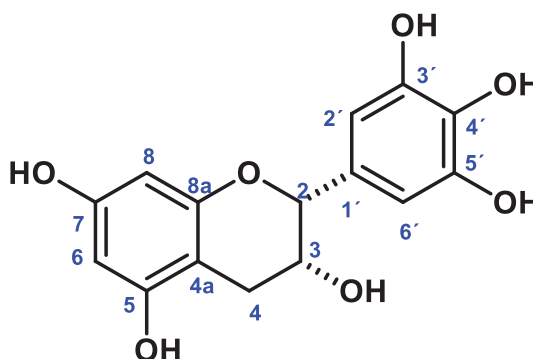


TABELA 8. DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DO COMPOSTO (-)-*EPI*-GALOCATEQUINA.

Posição	(-)- <i>epi</i> -galocatequina (experimental)			(-)- <i>epi</i> -galocatequina (NOMIZU et al. 2008)	
	δ ^1H ; mult., (J em Hz) ^a	δ ^{13}C ^{a,b}	L-D $J_{\text{H,C}}$ ^{a,b}	δ ^1H ; mult., (J em Hz) ^c	δ ^{13}C ^c
2	4,74 (m)	79,9	1', 2' e 6'	4,74 s	79,9
3	4,17 (m)	67,5		4,16 m	67,5
4pax	2,73 dd (16,5 e 5,0)	29,1	2, 3, 4a, 5 e 7	2,72 dd (16,5 e 3,0)	29,1
4peq	2,84 dd (16,5 e 4,5)		4a, 5 e 7	2,84 dd (17,0 e 4,5)	
5		157,6			157,7
6	5,93 d (2,5)	96,5	5 e 10	5,93 d (2,5)	96,4
8	5,91 d (2,5)	95,9	5,4a, 7 e 8	5,90 d (2,5)	95,9
7		157,9			158,0
4a		100,2			100,1
8a		157,2			157,3
1'		131,6			131,5
2' e 6'	6,51 s	107,0	2, 1', 2', 3', 5' e 6'	6,50 s	107,0
3' e 5'		146,8			146,7
4'		133,8			133,6

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura NOMIZU et al., 2008 (^1H , 500 MHz e ^{13}C , 125 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

4.1.7 Identificação estrutural da (-)-*epi*-catequina galato (ECG) (9)

Verificou-se a presença de um composto similar ao (-)-galato de *epi*-galocatequina cuja principal diferença consistiu no anel B. No espectro de RMN de ^1H pôde-se observar a presença de dois dupletos em δ_{H} 6,92 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) e 6,70 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz), e de um duplo duplete em δ_{H} 6,80 (1H, *dd*, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz), que apresentaram correlação direta com os carbonos em δ_{C} 115,7 (C-2'), 115,9 (C-5') e 119,4 (C-6'), respectivamente.

Através do mapa de correlação (^1H - ^{13}C) HMBC foi possível confirmar a localização dos sinais no anel B. O sinal do hidrogênio em δ_{H} 6,92 (*d*, H-2') relativo ao hidrogênio na posição meta correlacionou com os sinais dos carbonos em δ_{C} 119,4 (C-6') e 145,8 (C-4'). O sinal do hidrogênio em δ_{H} 6,70 (*d*, H-6'), hidrogênio na posição orto, correlacionou com os carbonos em δ_{C} 131,4 (C-1') e 145,9 (C-3'), bem como, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 6,80 (*dd*, C-6') correlacionou com os carbonos em δ_{C} 78,7 (C-2), 115,4 (C-2') e 145,8 (C-4').

Os dados de RMN de ^1H , mapas de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC e, em comparação com a literatura permitiram identificar o (-)-galato de *epi*-catequina (FIGURA 48) no chá verde de ambas as cultivares (FIGURAS 51 e 52, p. 93 e TABELA 9, p. 89).

FIGURA 48 - ESTRUTURA DA (-)-GALATO DE *EPI*-CATEQUINA (ECG).

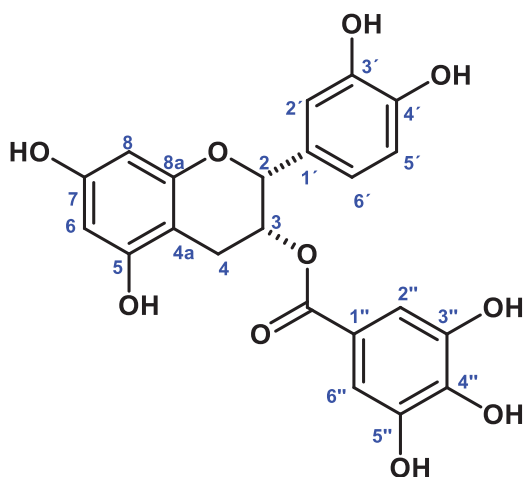


TABELA 9. DADOS DE RMN DE ¹H E ¹³C DA (-)-GALATO DE EPI-CATEQUINA

Posição	(-)-galato de epi-catequina (experimental)			(-)-galato de epi-catequina (NOMIZU et al., 2008)	
	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^a	$\delta^{13}\text{C}$ ^{a,b}	L-D $J_{\text{H,C}}$ ^{a,b}	$\delta^1\text{H}$; mult., (J em Hz) ^c	$\delta^{13}\text{C}$ ^c
2	5,02 <i>m</i>	78,7	1', 2' e 6'	5,02 <i>s</i>	78,6
3	5,53 <i>m</i>	70,0	3, 2', 6'	5,54 <i>sl</i>	70,0
4p _{ax}	2,84 <i>dd</i> (17,4 e 3,0)	26,9		2,84 <i>dd</i> (17,5 e 2,0)	26,9
4p _{eq}	2,98 <i>dd</i> (17,4 e 4,7)			2,98 <i>dd</i> (17,5 e 4,5)	
5		157,9			157,3
6	5,92 <i>d</i> (2,0)	96,5	8,5,7 e 10	5,946 <i>d</i> (3,0)	96,6
7		157,9			157,8
8	5,94 <i>d</i> (2,0)	95,9	6, 5, 7 e 10	5,952 <i>d</i> (2,5)	95,9
4a		99,4			99,4
8a		157,3			99,4
1'		130,9			131,5
2'	6,92 <i>d</i> (2,0)	115,4	2, 3' e 4'	6,90 <i>d</i> (2,0)	115,1
3' e 4'		145,9			145,9
5'	6,70 <i>d</i> (8,0)	115,9		6,69 <i>d</i> (8,0)	116,0
6'	6,80 <i>dd</i> (8,0 e 2,0)	119,4		6,80 <i>dd</i> (8,5 e 2,0)	119,4
1''		121,2			121,4
2'', 6''	6,94 <i>s</i>	110,3	1'', 4'', 3'', 5'', 7	6,94 <i>s</i>	110,2
3'', 5''		146,4			146,3
4''		139,9			139,8
7-C=O		167,7			167,6

^a Experimento realizado a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C em CD₃OD. Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura NOMIZU et al., 2008 (¹H, 500 MHz e ¹³C, 125 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

4.1.8 Identificação estrutural da (-)-*epi*-catequina (EC) (10)

Verificou-se a presença de um composto bastante similar ao galato de (-)-*epi*-catequina. A principal diferença consistiu na ausência da unidade galoila ligada ao anel C (FIGURA 49). Dessa forma, pôde-se observar a presença de dois dupletos em δ_H 6,97 (*d*, $J = 1,8$ Hz) e 6,75 (*d*, $J = 8,2$ Hz), e um duplo duplete em δ_H 6,80 (*dd*, $J = 8,2$ e 1,8 Hz), que apresentaram correlação direta com os sinais dos carbonos em δ_C 115,3 (C-2'), 115,9 (C-5') e 119,3 (C-6'), respectivamente.

O mapa de correlação a longa distância (1H - ^{13}C) HMBC permitiu confirmar a localização dos sinais no anel B através do sinal do hidrogênio em δ_H 6,97 (*d*, H-2') que correlacionou com os sinais dos carbonos em δ_C 79,9 (C-2), 119,3 (C-6') e 145,8 (C-4'). Além disso, o duplo duplete em δ 6,79 (C-6') correlacionou com os sinais dos carbonos em δ_C 79,9 (C-2), 115,3 (C-2') e 145,8 (C-4'), bem como, o duplete em δ 6,75 (*d*, H-5') correlacionou com os sinais dos carbonos em δ_C 132,0 (C-1) e 146,0 (C-3').

De acordo com os dados de RMN de 1H , mapas de correlação direta (1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (1H - ^{13}C) HMBC, e, em comparação com os dados disponíveis na literatura foi possível identificar o flavanol e a (-)-*epi*-catequina (FIGURA 46) nas amostras de chá verde (FIGURAS 51 e 52, p.93 e TABELA 10, p. 91).

FIGURA 49 - ESTRUTURA DA (-)-EPI-CATEQUINA.

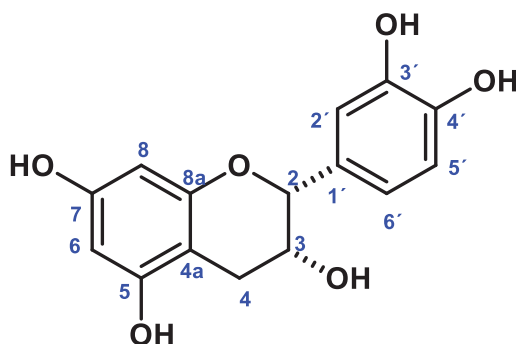


TABELA 10 - DADOS DE RMN DE 1H E ^{13}C DO COMPOSTO (-)-EPI-CATEQUINA

	(-)- <i>epi</i> -catequina (experimental)	(-)- <i>epi</i> -catequina
--	---	----------------------------

Posição				(USMAN et al. 2016)	
	δ^{1H} ; mult., (J em Hz) ^a	δ^{13C} ^{a,b}	L-D $J_{H,C}$ ^{a,b}	δ^{1H} ; mult., (J em Hz) ^c	δ^{13C} ^c
2	4,81 (m)	79,8	1', 2' e 6'	4,83 (sl)	79,9
3	4,19 (m)	67,5		4,19 (m)	67,5
4p_{ax}	2,73 dd (16,5 e 2,2)	29,2		2,73 dd (16,8 e 2,7)	29,3
4p_{eq}	2,85 dd (16,5 e 4,1)			2,85 dd (16,8 e 4,8)	
5		157,7			157,4
6	5,93 d (2,5)	96,7	5 e 10	5,93 d (2,3)	96,4
7		157,9			157,9
8	5,91 sl	96,4		5,96 d (2,3)	95,9
4s		100,1			100,1
8a		157,3			157,7
1'		132,3			132,3
2'	6,97 d (1,8)	115,4	2', 3', 4' e 6'	6,99 d (1,7)	115,3
3'		146,0			145,9
4'		146,0			145,8
5'	6,76 d (8,2)	115,7	1', 3' e 4'	6,77 d (8,2)	115,9
6'	6,80 dd (8,2 e 1,8)	119,4	2', 3', 4' e 5'	6,81 dd (8,2 e 1,7)	119,4

^a Experimentos realizados a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C. Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura USMAN et al., 2016 (¹H, 400 MHz e ¹³C, 100 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

4.1.9 Identificação estrutural do ácido gálico (11)

A análise do espectro de RMN de ^1H permitiu observar um sinal em δ_{H} 7,09 (s) que correlacionou diretamente aos carbonos em δ_{C} 110,1 (C-6) e 140,2 (C-4). De acordo com os dados de RMN de ^1H , mapas de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC, e, em comparação com os dados disponíveis na literatura foi possível identificar o ácido gálico (FIGURA 50) nas amostras de chá verde (FIGURAS 51 e 52, p. 92).

FIGURA 50 - ESTRUTURA DO ÁCIDO GÁLICO

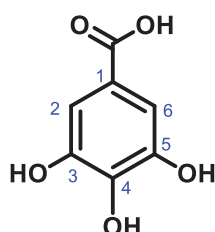


TABELA 11 - DADOS DE ^1H E ^{13}C DO ÁCIDO GÁLICO.

Posição	Ácido gálico (experimental)		Ácido gálico (WANG et al.2015)	
	δ^1_{H} ; mult., (J em Hz) ^a	δ^{13}_{C} ^{a,b}	δ^1_{H} ; mult., (J em Hz) ^c	δ^{13}_{C} ^c
1	-	-		122,0
2 e 6	7,09 (s)	110,1	7,08 (s)	110,4
3	-	-		146,4
4		139,8		139,6
5	-	-		146,4
C=O		168,8		170,4

^a Experimentos realizados a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^b Dados determinados por experimentos de RMN HSQC e HMBC. ^c Dados comparados com a literatura WANG et al., 2015 (^1H , 400 MHz e ^{13}C , 100 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

FIGURA 51 - AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC DO CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD). (7) (-)-GALATO DE EPI-

GALOCATEQUINA (EGCG); (8) (-)-*EPI*-GALOCATEQUINA (EGC); (9) (-)-GALATO DE *EPI*-CATEQUINA (ECG); (10) (-) *EPI*-CATEQUINA (EC) E (11) ÁCIDO GÁLICO.

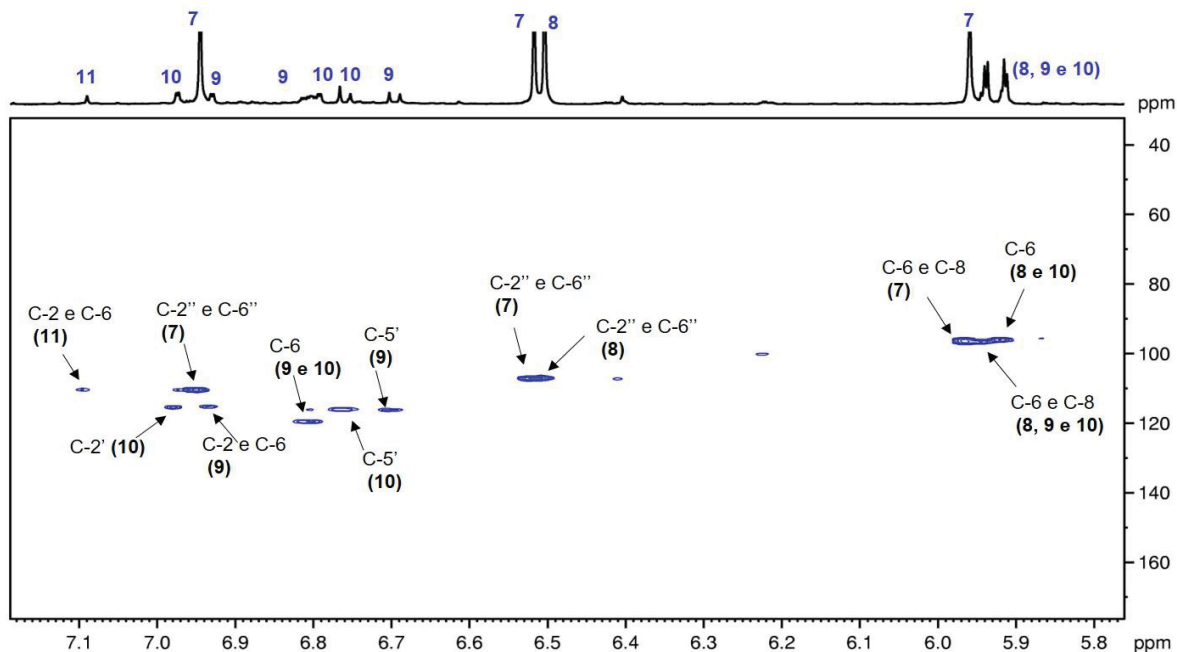
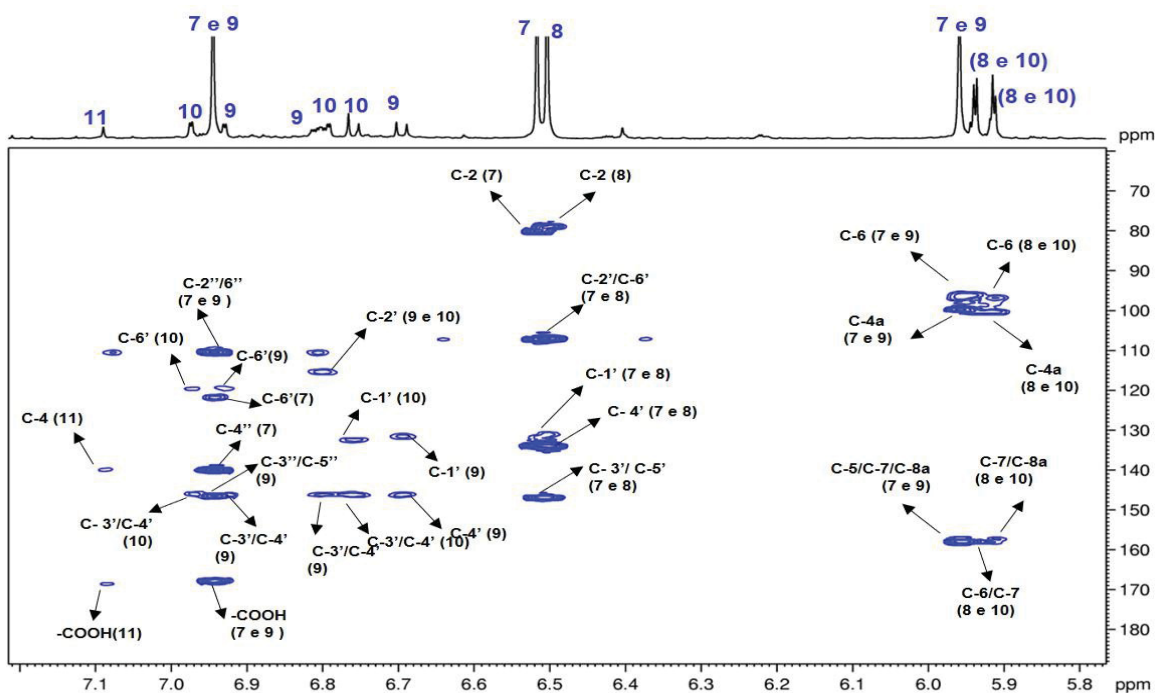


FIGURA 52 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,20-5,80 DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC DO CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD). (7) (-)-GALATO DE *EPI*-GALOCATEQUINA (EGCG); (8) (-)-*EPI*-GALOCATEQUINA (EGC); (9) (-)-GALATO DE *EPI*-CATEQUINA (ECG); (10) (-)-*EPI*-CATEQUINA (EC); (11) ÁCIDO GÁLICO.



4.1.10 Identificação estrutural da cafeína (12)

Analisando-se o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 53) do chá verde foram observados três simpletos em δ_{H} 3,96, 3,53 e 3,35, relativos a três hidrogênios cada e, outro simpleto em δ_{H} 7,84 (1H). De acordo com o mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC (FIGURAS 54, p. 95) esses sinais estão ligados aos carbonos em δ_{C} 33,9, 30,1 e 28,3 e 144,0, respectivamente, indicando a presença de três grupos *N*-metílicos (*N*-CH₃) e um hidrogênio aromático.

FIGURA 53 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DAS REGIÕES ENTRE δ 7,90-7,70 E δ 4,00-3,32 REFERENTE A CAFEÍNA NA AMOSTRA DE CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') (^1H , 600 MHz, CD₃OD).

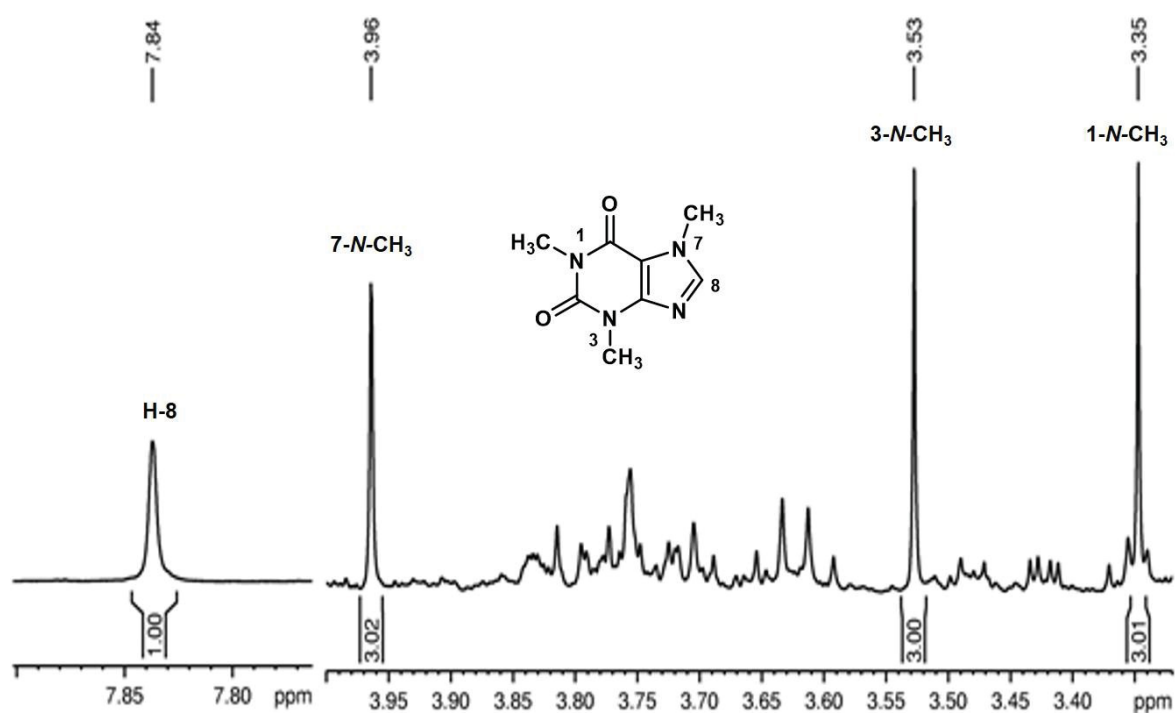
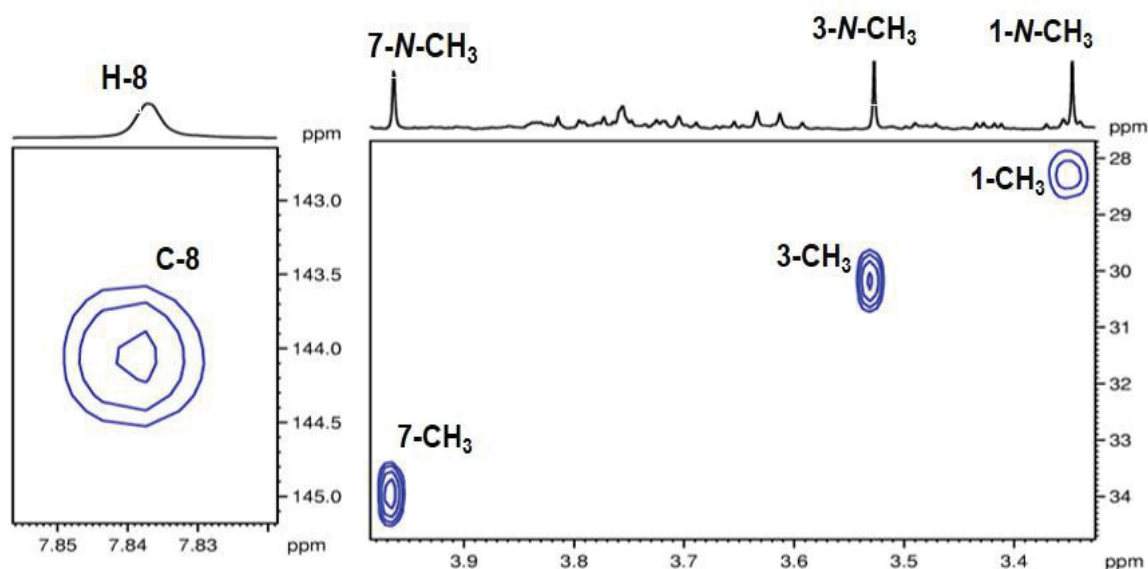


FIGURA 54 - AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC DA AMOSTRA DE CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') PARA A CAFEÍNA (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD).



A correta localização dos grupos $N\text{-CH}_3$ foi estabelecida através do mapa de correlação a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC (FIGURA 55, p. 96). O sinal do hidrogênio em δ_{H} 3,96 (7- $N\text{-CH}_3$) apresentou correlações à longa distância com os carbonos em δ_{C} 108,9 (C-4) e 144,0 (C-8). O sinal do hidrogênio em δ_{H} 3,53 (3- $N\text{-CH}_3$) apresentou correlação à longa distância com os carbonos em δ_{C} 153,4 (C-2) e 150,0 (C-4). E, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 3,35 (3- $N\text{-CH}_3$) apresentou correlações com os carbonos em δ_{C} 153,4 (C-2) e 156,8 (C-6). Além disso, o simpleto em δ_{H} 7,84 apresentou correlações à longa distância com os carbonos em δ_{C} 108,9 (C-4) e 150,0 (C-5) confirmando sua localização na posição C-8.

Os dados de RMN de ^1H , mapas de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC (FIGURA 52, p. 96), bem como, a comparação com os espectros de RMN de uma amostra autêntica de cafeína (padrão) (FIGURAS 57 e 58, p. 97) permitiram confirmar a presença da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (FIGURA 56 e TABELA 11, p. 96) nas amostras de chás verde de ambas as cultivares.

FIGURA 55 - AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC DA AMOSTRA DE CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') PARA A CAFEÍNA (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD)

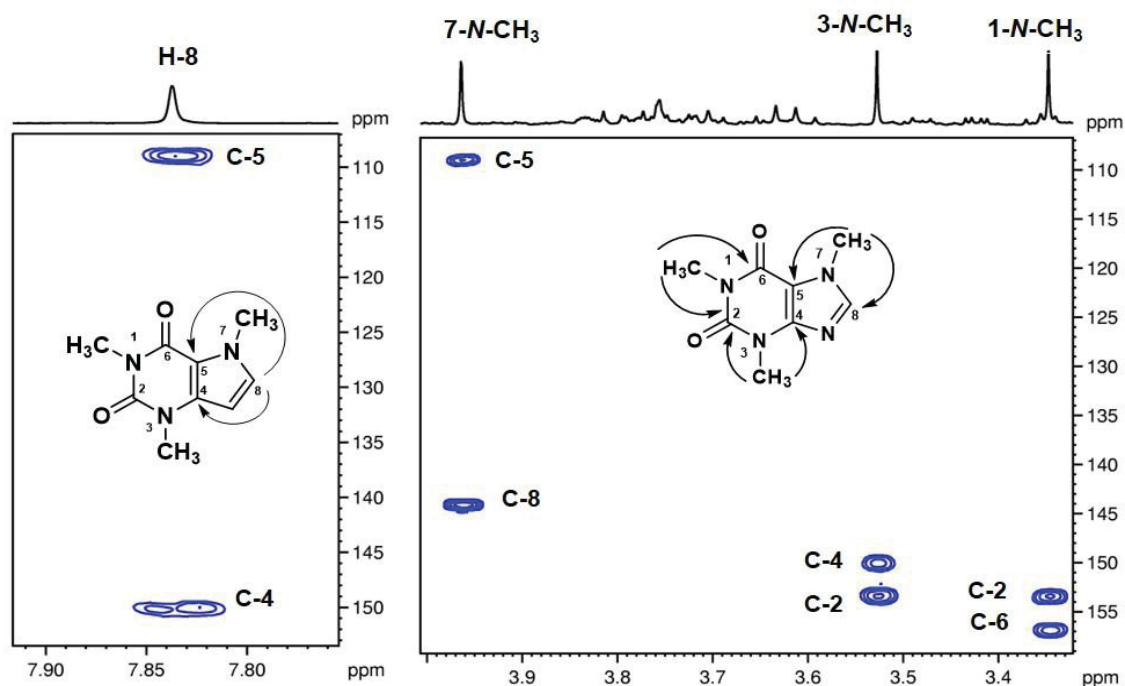


FIGURA 56 - ESTRUTURA DA CAFEÍNA.

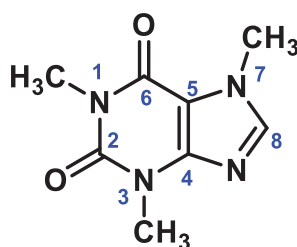


TABELA 12. DADOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA CAFEÍNA.

Posição	Cafeína (chá verde)			Cafeína (padrão)	
	$\delta^1\text{H}$; mult. ^a	$\delta^{13}\text{C}$ ^{a,b}	L-D $J_{\text{H,C}}$ ^{a,b}	$\delta^1\text{H}$ mult. ^c	$\delta^{13}\text{C}$ ^c
1-N-CH ₃	3,35 s	28,3	2 e 6	3, 33 s	28,3
2		153,4			153,3
3-N-CH ₃	3,53 s	30,1	4 e 2	3, 51 s	30,2
4		150,0			149,9
5		108,9			108,8
6		156,8			156,7
7-N-CH ₃	3,96 s	33,9	5 e 8	3,96 s	33,9
8	7,84 s	144,0	4 e 5	7,85 s	144,0

^a Experimento de RMN realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como referência em δ 0,00. ^b Dados de ^{13}C determinados por experimentos de RMN a uma ligação (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC. ^c Dados de RMN obtidos de um padrão de cafeína (400 MHz para ^1H e 100 MHz em CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm

FIGURA 57 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA CAFEÍNA PADRÃO (400 MHz, CD_3OD).

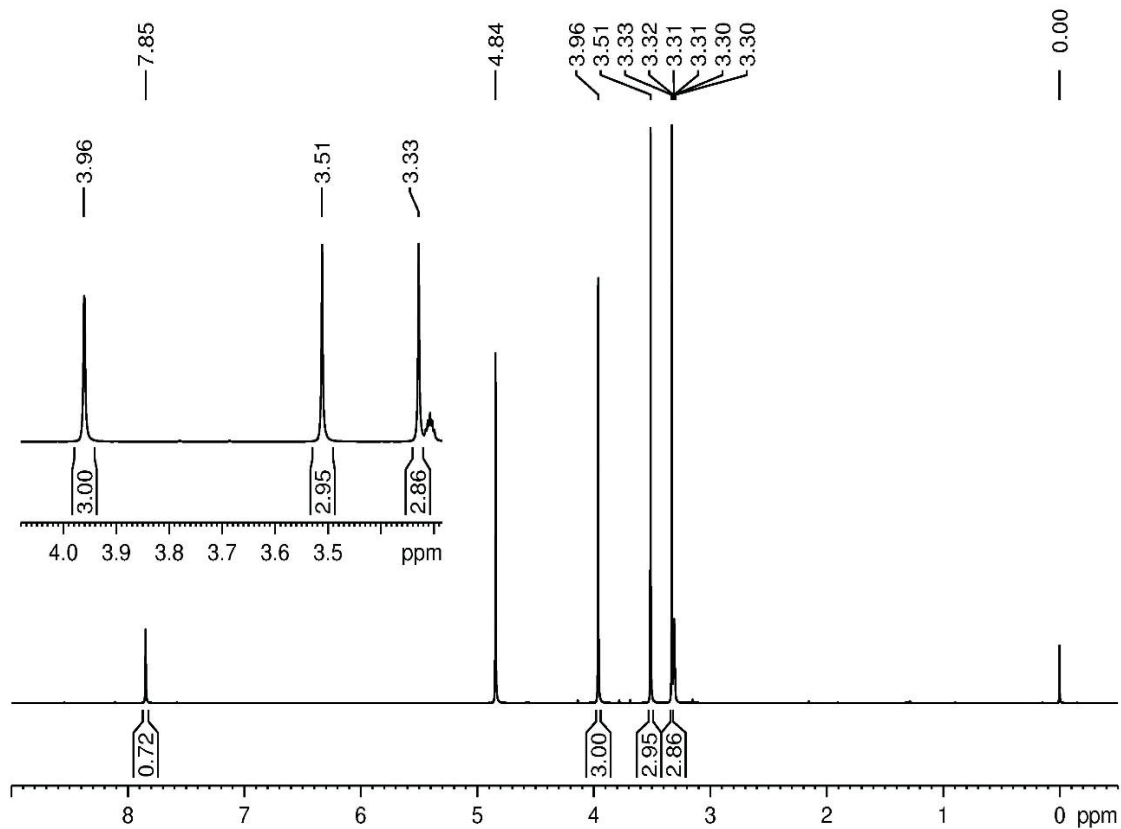
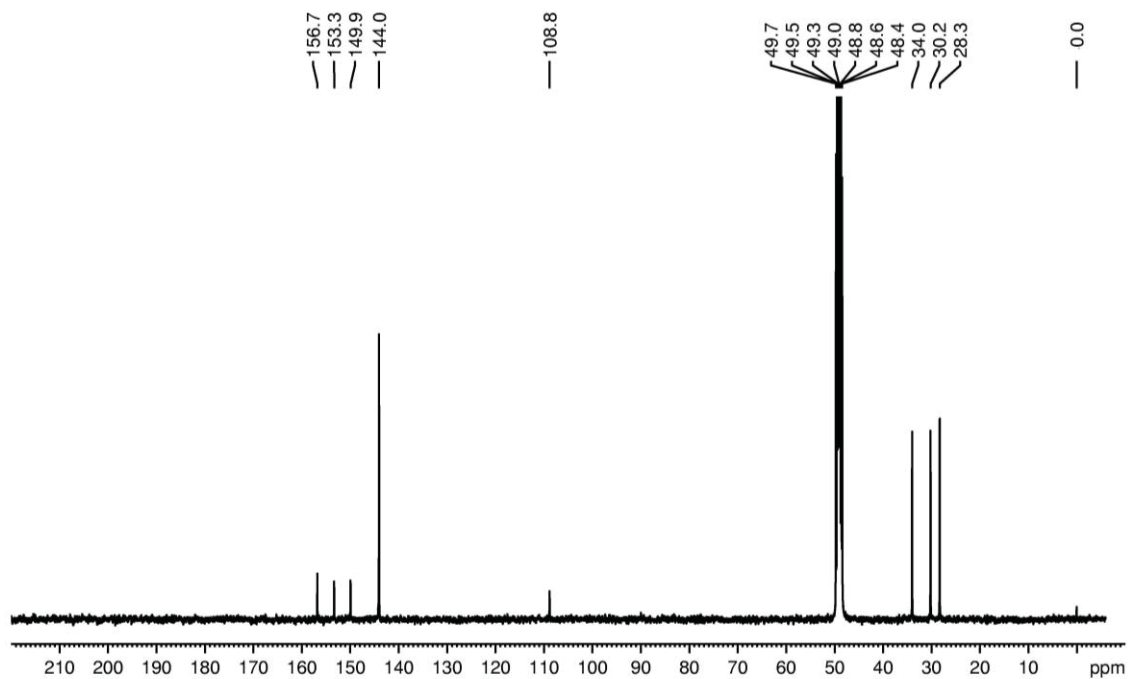


FIGURA 58 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE UM PADRÃO DE CAFEÍNA (100 MHz, CD_3OD).

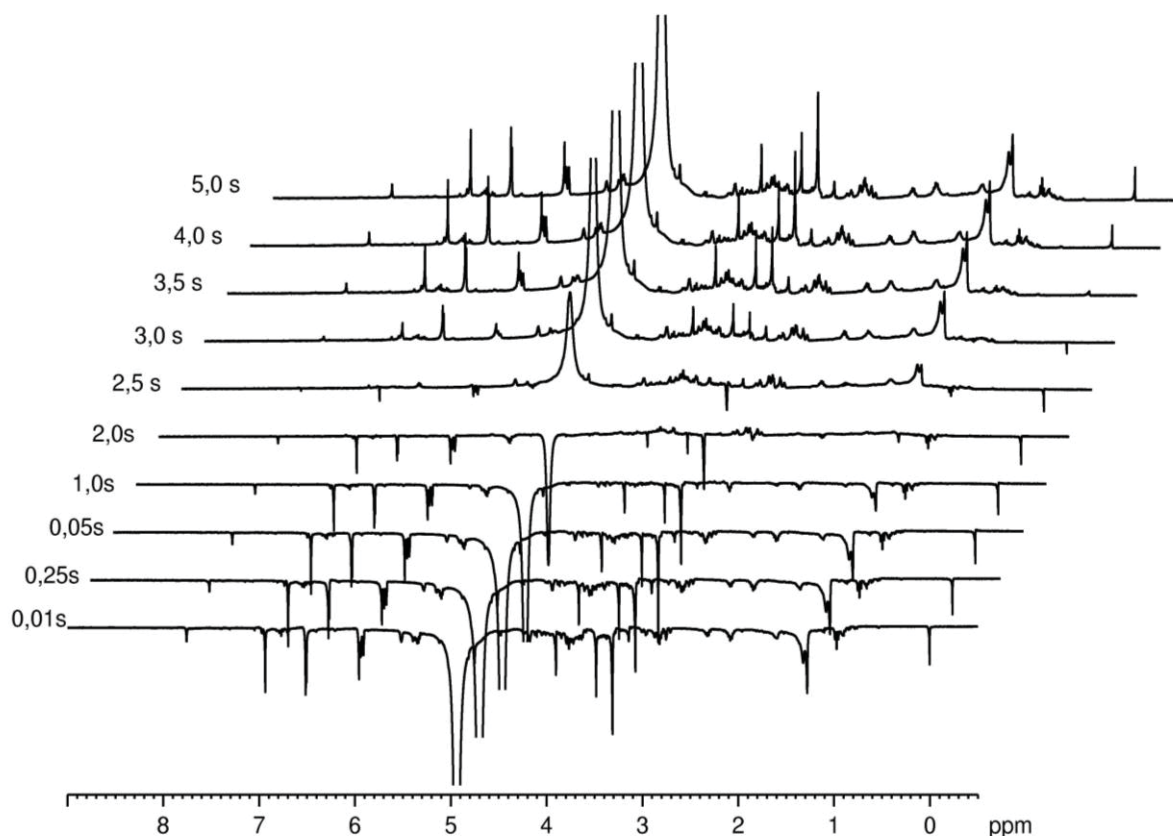


4.6 RMN HR-MAS DE ^1H QUANTITATIVO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES *C. sinensis* 'Yabukita' E *C. sinensis* 'Yutakamidori'

O experimento de inversão-recuperação é utilizado para determinar o T_1 (máximo), ou seja, o T_1 dos pacotes de spins mais lentos de um composto ou mistura de composto (CLARIDGE, 2009; PAULI et al., 2012). Esse valor é utilizado no cálculo do D1. Assim, para garantir uma medida quantitativa por RMN, deve-se considerar que o tempo de aquisição (aq) somado ao tempo de espera (D1), deve ser 5 a 7 vezes o T_1 , considerando o pulso de (PAULI et al., 2014).

De acordo com esse experimento, foi observado que o tempo de 4 s foi o tempo necessário para os spins mais lentos relaxarem (FIGURA 59). Dessa forma, o D1 utilizado para as medidas quantitativas dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H dos chás verdes das cultivares (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori') foi de o $D1 = 24\text{s}$ ($D1 = 5 \times T_1 + AQ = 24\text{s}$).

FIGURA 59 - EXPERIMENTO DE INVERSÃO-RECUPERAÇÃO DO CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita') OBTIDO POR RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) UTILIZANDO O INTERVALO DE TEMPO ENTRE OS PULSOS DE 0,01 s ATÉ 5,0s



Para as análises quantitativas por RMNq, deve ser escolhido um sinal do composto de interesse de maior intensidade que não esteja sobreposto a outros sinais dele ou de outro composto (CLARIDGE, 2009; SANTOS; COLNAGO, 2013). De acordo com esse critério, a partir do espectro de RMN HR-MAS de ^1H dos chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' ao longo dos sete meses de colheita foram selecionados quatro compostos: ácido linolênico, teanina, *epi*-catequina e cafeína (FIGURA 61, 101, TABELA 13).

TABELA 13 - IDENTIFICAÇÃO DOS SINAIS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori') AO LONGO A SAFRA.

Composto	Sinal atribuído	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$; mult, $J = \text{Hz}$
Ácido linolênico	18- CH_3	0,97 (t, 3H, 7,5 Hz)
Teanina	8- CH_3	1,11 (t, 3H, 7,1 Hz)
<i>epi</i> -catequina	2'- CH	6,97 (d, 1H, 1,8 Hz)
Cafeína	8-H	δ_{H} 7,79 (s, 1H)

^a Experimento de RMN HR-MAS de ^1H realizado a 400 MHz em CD_3OD . Utilizando o TMS como referência em δ 0,00 ppm.

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H dos chás verdes de ambas as cultivares foram adquiridos em condições quantitativas de acordo com os parâmetros descritos no item 3.4.1, p. 48. Uma amostra de timol (25 mmol) foi utilizada como padrão ERETIC, e foi adquirido o espectro de RMN HR-MAS de ^1H nas mesmas condições quantitativas que as amostras de chá verde. A pureza do timol foi averiguada pela técnica de GC-MS (ANEXO 1, p. 154).

A partir do espectro de RMN HR-MAS de ^1H do timol (400 MHz; CD_3OD) (FIGURA 60, p. 100) foram observados três simpletos em δ 1,16, 1,18 e 2,20 integrando para três hidrogênios cada, referentes aos grupos metilas nas posições 8- CH_3 , 9- CH_3 e 10- CH_3 , respectivamente. Além disso, foi observado um hepteto em δ 3,20 (1H, $J = 7,0$ Hz), dois dupletos em δ 6,55 (1H, $J = 1,5$ Hz, H-6), 6,97 (1H, $J = 8,0$ Hz, H-3) e um duplo duplete em δ 6,57 (1H, $J = 1,5$ e 8,0 Hz, H-4). Para a quantificação dos compostos, a área do sinal em δ 6,97 (1H, H-3) foi integrada e utilizada para os cálculos da concentração.

FIGURA 60 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ¹H QUANTITATIVO DO TIMOL (400 MHz, CD₃OD). ÁREA DO SINAL DE HIDROGÊNIO EM δ 6,96 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-3) UTILIZADA COMO SINAL DO ERETIC.

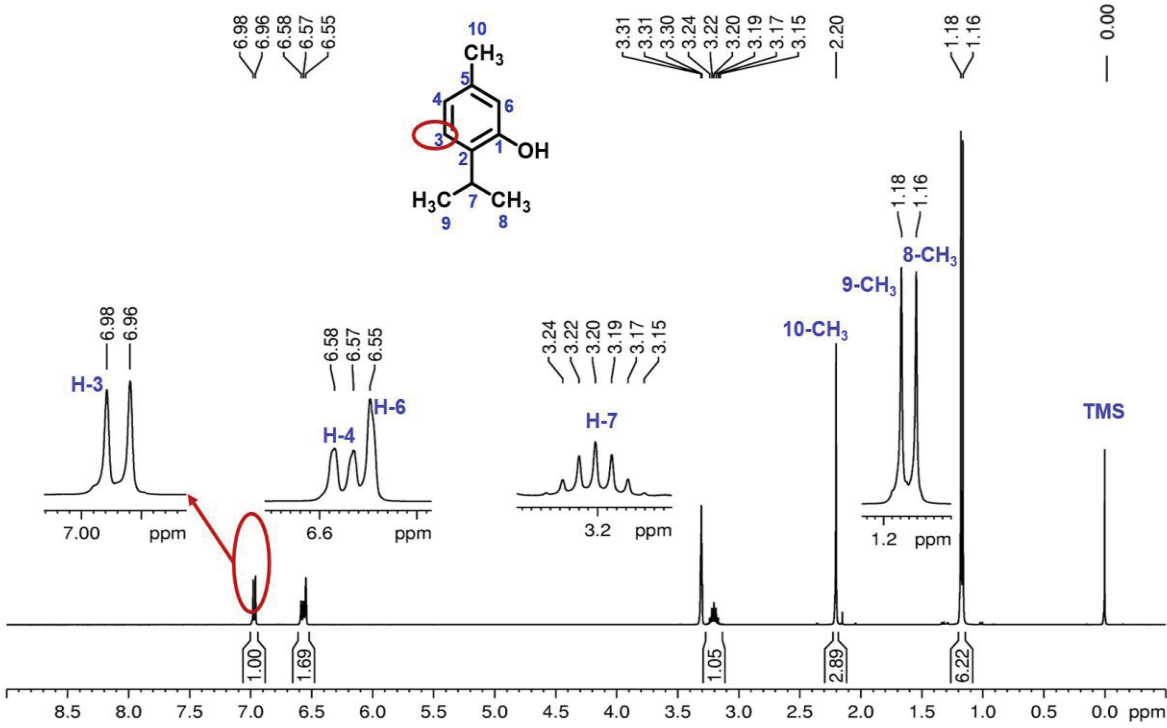
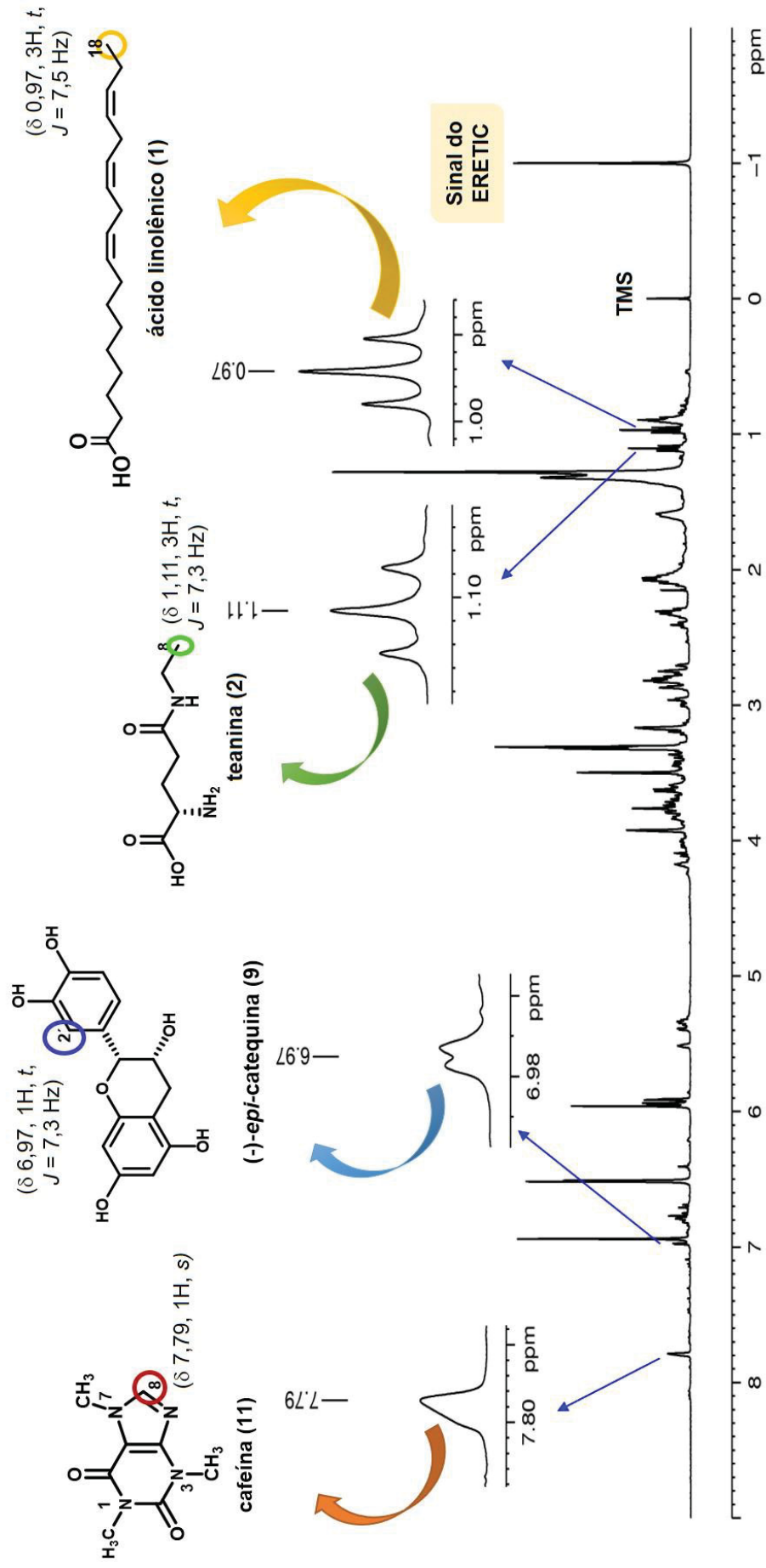


FIGURA 61 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H QUANTITATIVO DO CHÁ VERDE DE *C. sinensis* 'Yabukita' (400 MHz, CD_3OD). OS SINAIS EM DESTAQUE SÃO REFERENTES AOS COMPOSTOS QUANTIFICADOS E O SINAL DO PADRÃO ERETIC EM -1,00 ppm.



4.7 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS CULTIVARES DE CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yabukita')

As amostras de chá verde da cultivar 'Yabukita' apresentaram perfis espectrais semelhantes ao longo dos sete meses da safra de outubro de 2016 a abril de 2017. Essas semelhanças impedem a diferenciação dos chás verdes obtidos em diferentes períodos apenas pela inspeção visual dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H . Desse modo, a análise de componentes principais (PCA) foi empregada para investigar as possíveis diferenças e similaridades da composição química do chá verde ao longo da safra.

Os sinais nos espectros de RMN devem estar alinhados para que a análise quimiométrica torne-se satisfatória. No caso do chá verde, estudos têm demonstrado que as catequinas podem interagir com a cafeína formando complexos. Hayashi et al. (2004) reportaram através de experimento de NOESY obtido por RMN em solução, que a interação intermolecular das catequinas com a cafeína pode ocorrer via anel A, B ou B' das catequinas. Além da interação intermolecular, as pequenas diferenças de pH, e concentrações dos sais no solo entre as amostras, podem contribuir para as mudanças no deslocamento químico dos sinais da cafeína. Assim, os sinais da cafeína podem mudar de amostra para amostra devido a esses fatores.

A literatura reporta duas opções para realizar o alinhamento dos sinais: alinhamento utilizando algoritmos específicos (COW e Icoshift) ou *bucketing* (SAVORANI et al., 2013). Nesse trabalho, o *bucketing* foi utilizado como forma de alinhamento e redução da dimensionalidade dos dados. Os *buckets* avaliados foram 0,04, 0,08 e 0,1 ppm. Verificou-se que o *bucket* de 0,08 ppm proporcionou melhor alinhamento que os demais testados e, em consequência disso, proporcionou um melhor agrupamento das amostras em PCA.

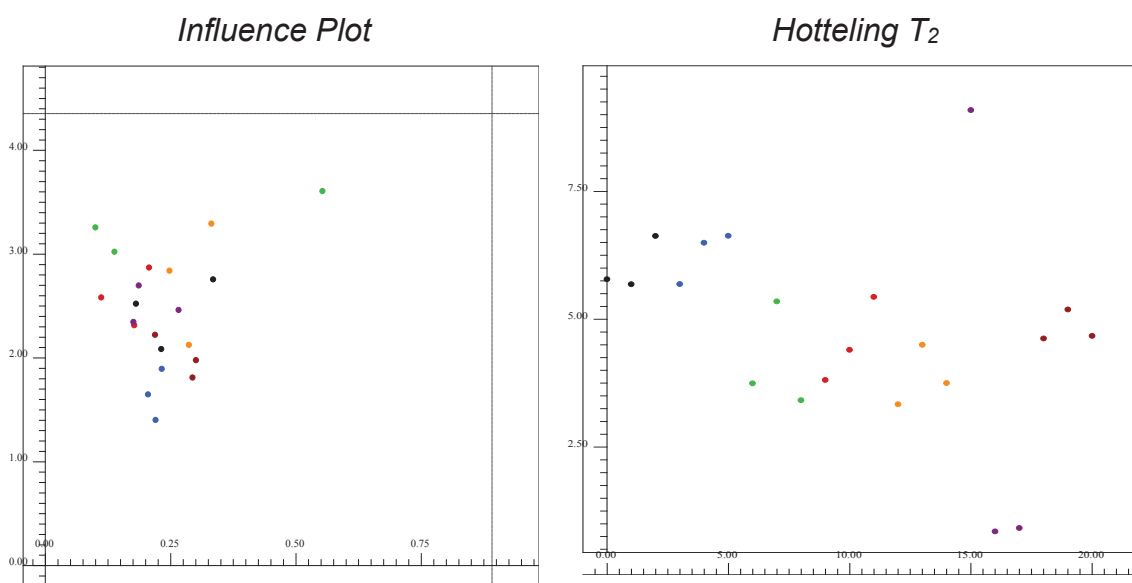
Em geral, a concentração dos metabólitos nas plantas pode variar em muitas ordens de magnitude (SIMMLER et al., 2017). Devido a isso, é importante considerar a influência dos compostos de menor intensidade antes da análise quimiométrica, para evitar a predominância da contribuição dos metabólitos majoritários. Dentre os pré-processamentos testados, o autoescalamento ou escalamento por unidade de variância permitiu um claro

agrupamento das amostras. Além disso, a área dos sinais foi determinada através do modo de integração especial, bem como, todos os espectros tiveram as linhas de base e as fases corrigidas manualmente.

Para o pré-tratamento nas linhas dos espectros foi escolhido o escalamento em relação à intensidade total dos sinais, o qual normaliza as integrais de cada *bucket* em relação à intensidade total dos sinais de um espectro; sendo assim, as diferentes quantidades de amostras não influenciam na discriminação dos grupos. E o pré-processamento escolhido para as colunas foi o escalamento por unidade de variância, onde os dados são autoescalados (AMIX, 2008).

Inicialmente, o conjunto amostral foi submetido à análise de amostras anômalas (*outliers*) por meio dos gráficos de *Influence Plot* e *Hottelling T₂* (FIGURA 62). O gráfico de *Influence Plot* mostra no eixo Y a posição de cada amostra em relação à variância explicada pelas PCs consideradas, enquanto no eixo X a posição de cada amostra é relacionada ao centro do modelo. O gráfico *Hottelling T₂* apresenta, ao longo do eixo vertical, a distância dos espectros individuais ao centro do modelo. As amostras que estiverem fora do limite de confiança são consideradas *outliers* em potencial (AMIX, 2008). A análise dos gráficos de *Influence Plot* e *Hottelling T₂* permitiu observar a ausência de *outliers* para os chás verdes da cultivar 'Yabukita'.

FIGURA 62 - INFLUENCE PLOT E HOTTELING T₂ DAS AMOSTRAS DE CHÁS VERDES DA CULTIVAR YBP EM FUNÇÃO DO PERÍODO DE SAFRA.



Os gráficos de *scores* e *loadings* relativos à PCA para o chá verde da cultivar 'Yabukita' são apresentados na FIGURA 63, p. 106. A primeira componente principal (PC1) descreveu 47,58% da variância dos dados e a segunda componente principal (PC2) 18,38%, totalizando 65,96%.

A análise do gráfico de *scores* (PC1 x PC2) (FIGURA 63, p. 106) apresentou a formação de quatro grupos. O primeiro foi constituído pelos chás verdes dos meses de outubro que ocuparam a região negativa de PC1 e positiva de PC2. O segundo grupo foi composto pelas amostras dos meses de novembro, dezembro e março que foram dispostos majoritariamente no lado positivo de PC1 e negativo de PC2. O terceiro grupo foi caracterizado pelos chás verdes dos meses de janeiro e fevereiro que ocuparam a região negativa de PC1 e PC2. Por último, o quarto grupo foi composto pelo mês de abril que ocupou a região positiva de PC1 e PC2.

A investigação dos metabólitos responsáveis pela distinção entre os meses de safra do chá verde pôde ser realizada através da análise do gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) (FIGURA 63, p. 106). Este permitiu observar que um conjunto de compostos químicos majoritários e minoritários foi responsável pela discriminação dos meses de produção do chá verde da cultivar 'Yabukita'. Contudo, a discussão será realizada em função dos compostos químicos que mais influenciaram na variância dos dados e que foram identificados até o momento.

A análise do gráfico de *loadings* dos chás verdes da cultivar 'Yabukita' permitiu inferir que os compostos alifáticos de cadeia longa (*buckets* em δ 2,00, 1,60, 1,54 e 1,28) influenciaram na discriminação do chá verde do mês de outubro, o início da safra do chá verde.

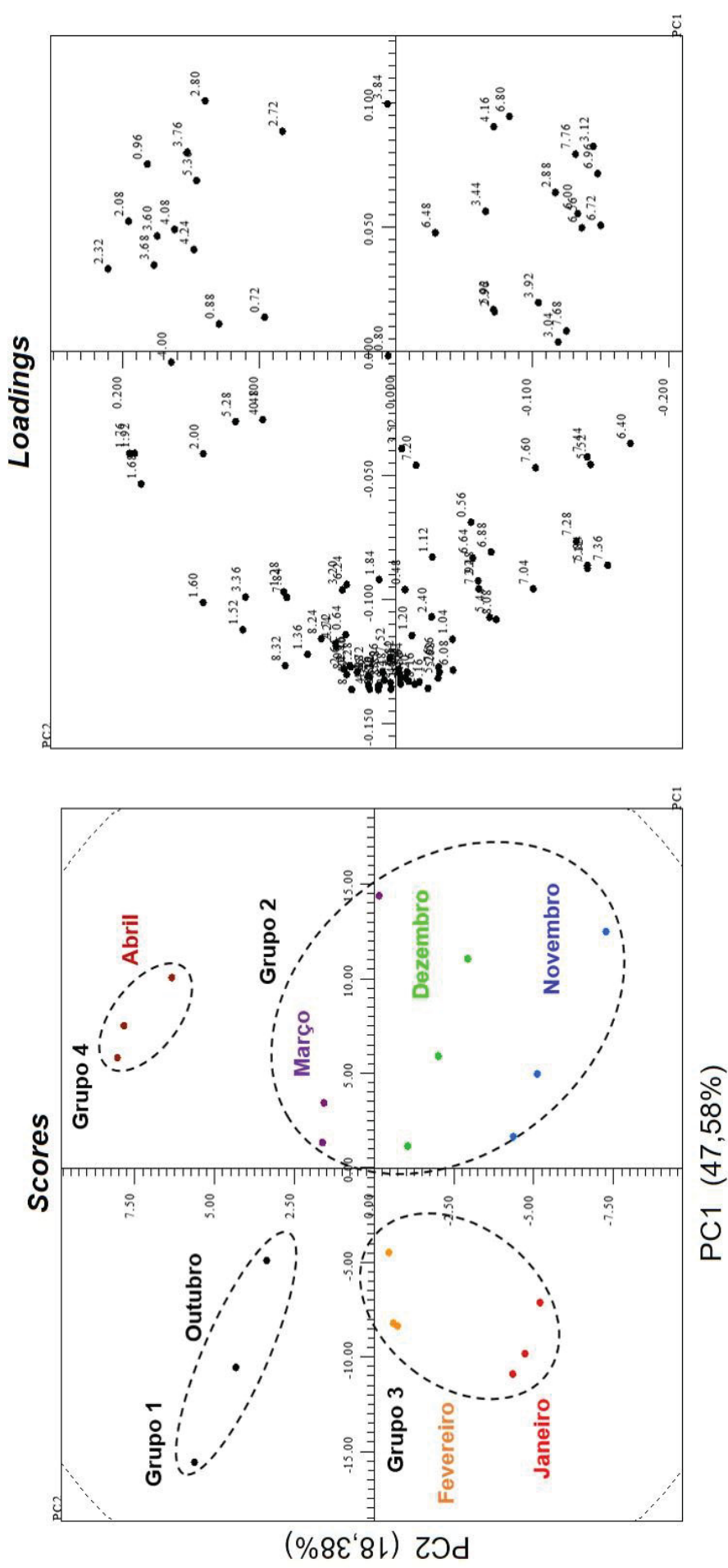
Os meses de novembro, dezembro e março foram influenciados pelo galato de *epi-galocatequina* (*buckets* em δ 6,96, 6,48, 5,52, 2,96 e 2,88), galato de *epi-catequina* (*buckets* em δ 6,96, 6,80, 6,48, 5,92 e 4,16), *epi-catequina* (*buckets* δ 6,96, 6,72 e 4,16), bem como, pela cafeína (*buckets* em δ 7,76, 3,92 e 3,44 referentes ao hidrogênio aromático e aos hidrogênios *N*-metílicos, respectivamente).

O agrupamento das amostras de chás verdes dos meses de janeiro e fevereiro foi influenciado dentre outros compostos químicos pelo aminoácido,

teanina, (*bucket* em δ 1,14) referente ao hidrogênio metílico em δ 1,11 (*t*, $J = 7,3$ Hz).

E o final da safra do chá verde, mês de abril, foi influenciado dentre outros compostos químicos pelo α -ácido linolênico (*bucket* em δ 0,96 referente ao sinal em δ 0,97, *t*, $J = 7,5$ Hz), e compostos alifáticos (*buckets* em δ 2,32, 2,08, 0,88 e 0,72) (FIGURA 63, p. 106).

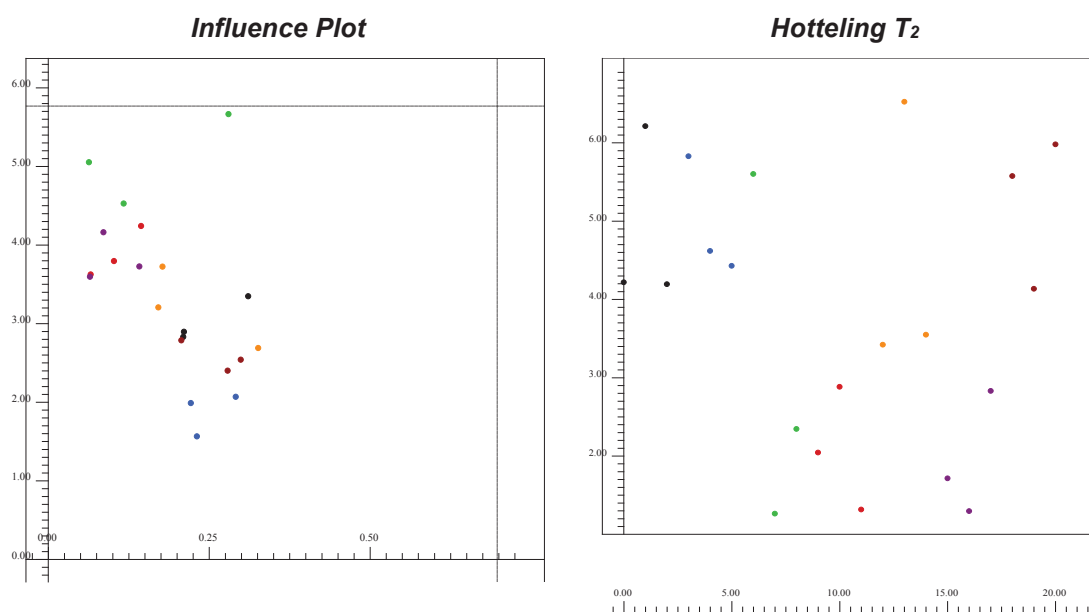
FIGURA 63 - GRÁFICO DE SCORES DE PC1 VERSUS PC2 UTILIZANDO AS TRIPLICATAS DO CHÁ VERDE DA ESPÉCIE *C. sinensis* 'Yabukita' DURANTE O PERÍODO DE SAFRA. GRÁFICO DE LOADINGS DE PC1 VERSUS PC2 EXPLICANDO A INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS NA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS APRESENTADAS NOS SCORES.



4.8 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS CULTIVARES DE CHÁ VERDE (*C. sinensis* 'Yutakamidori')

Os chás verdes da cultivar 'Yutakamidori' também apresentaram perfis espectrais semelhantes ao longo do período de safra. Sendo assim, a análise de componentes principais foi empregada. Inicialmente, os espectros de RMN HR-MAS de ^1H dos chás verdes da cultivar YMP foram submetidos à análise de amostras anômalas. Através dos gráficos de *Influence plot* e *Hotteling T₂* foi observada a ausência de *outliers* (FIGURA 64).

FIGURA 64 - INFLUENCE PLOT E HOTTELING T₂ DAS AMOSTRAS DE CHÁS VERDES DA CULTIVAR 'YUTAKAMIDORI' EM FUNÇÃO DO PERÍODO DE SAFRA.



Os gráficos de *scores* e *loadings* relativos à PCA para a cultivar de chá verde YMP são apresentados na Figura 65, p. 109. A primeira componente principal (PC1) descreveu 55,65% da variância dos dados e a segunda componente principal (PC2) 20,01%, totalizando 75,66%.

A análise do gráfico de *scores* (PC1 x PC2) (FIGURA 65, p. 109) apresentou a formação de três grupos. Com intuito de identificar os compostos químicos responsáveis pela discriminação dos meses da safra do

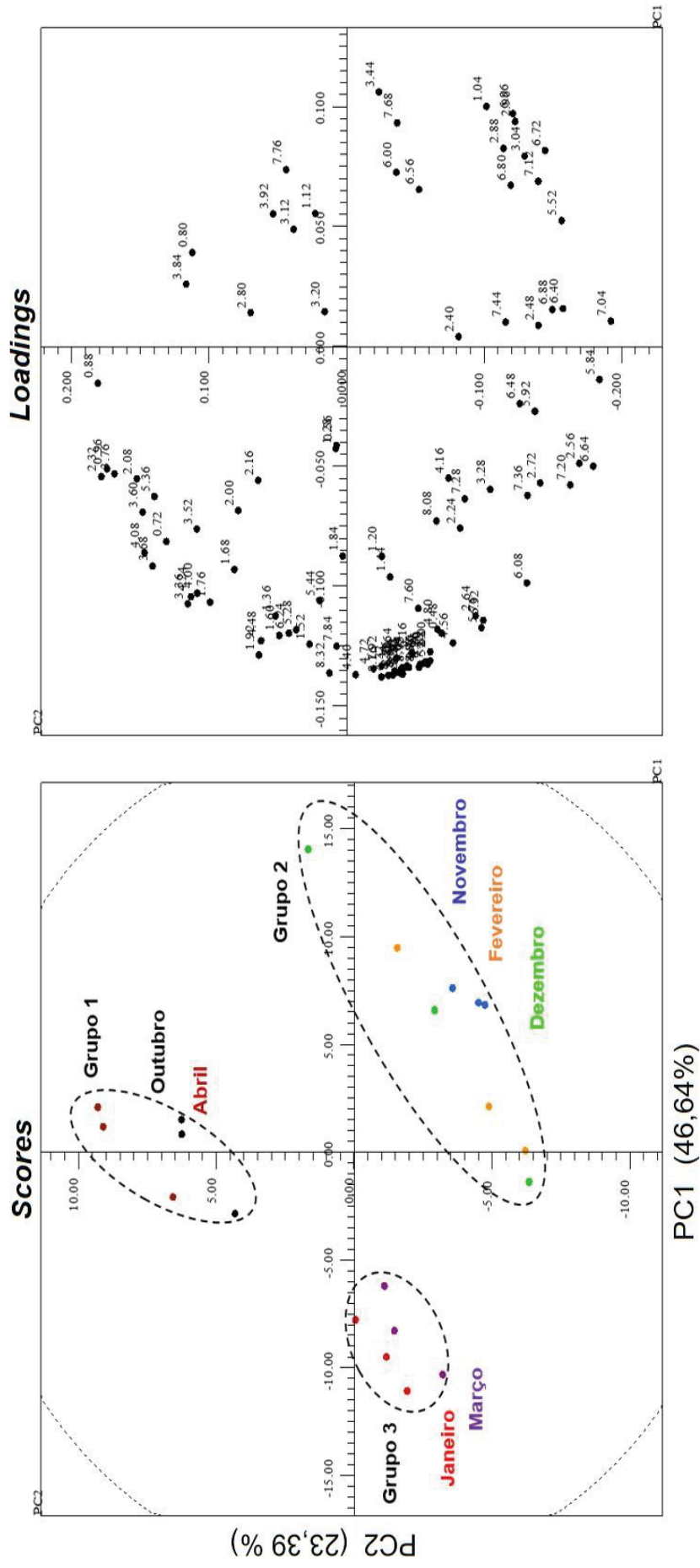
chá verde (*C. sinensis* 'Yutakamidori') observados no gráfico de *scores* foi realizada a análise do gráfico de *loadings*. Essa análise permitiu a identificação dos metabólitos que mais influenciaram na variância dos dados.

O primeiro grupo foi constituído pelas amostras de chá verde dos meses de outubro e abril que ocuparam a região positiva de PC2. A análise do gráfico de *loadings* (FIGURA 65, p. 109) dessa região permitiu inferir que os compostos químicos, teanina (*bucket* em δ 1,14), α -ácido linolênico (*bucket* em δ 0,98), a cafeína (*buckets* em δ 3,46, 3,94 e 7,78) e os ácidos graxos de cadeia longa (*buckets* em δ 0,74, 0,82, 0,90, 1,30 e 1,54) influenciaram na discriminação do chá verde dos meses de outubro e abril, períodos inicial e final da safra.

O segundo grupo foi formado pelas amostras de novembro, dezembro e fevereiro que ocuparam majoritariamente a região positiva de PC1 e negativa de PC2 (FIGURA 65, p. 109). Os *buckets* relacionados às catequinas, *epi*-catequina (*buckets* em δ 6,97 e 6,74) e galato de *epi*-galocatequina (*bucket* em δ 6,90 e 6,50) foram responsáveis por essa discriminação.

Por fim, o terceiro grupo foi composto pelos meses de janeiro e março, os quais ficaram dispostos principalmente na região negativa de PC1 e PC2 (FIGURA 65, p. 109). Os *loadings* responsáveis por essa discriminação foram os *buckets* em δ 7,62, 7,46, 7,38 e 7,30 que estão em menor concentração e, por isso, não foi possível identificá-los.

FIGURA 65 - GRÁFICO DE SCORES DE PC1 X PC2 UTILIZANDO AS TRIPLICATAS DOS CHÁS VERDES DA ESPÉCIE *C. sinensis* 'Yutakamidori' DURANTE OS MESES DE PRODUÇÃO. GRÁFICO DE LOADINGS DE PC1 VERSUS PC2 EXPLICANDO A INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS NA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS APRESENTADAS NOS SCORES.



4.9 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS ABIÓTICOS SOB O PERFIL METABOLÔMICO DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES *C. sinensis* 'Yabukita' E *C. sinensis* 'Yutakamidori'

A composição química das folhas da espécie *C. sinensis*, utilizada na produção do chá verde, pode apresentar alterações metabólicas dependendo do tipo de cultivar, da origem geográfica, altitude, tipo de processamento das folhas, mudanças climáticas e dos parâmetros climáticos, tais como temperatura, radiação solar, chuva e solo. Portanto, a análise da composição química correlacionada com os parâmetros climáticos pode gerar dados que auxiliem no controle de qualidade do chá verde (LEE et al., 2010; JI et al., 2017; CHENG; WEI; WANG, 2015).

Conforme observado, os perfis metabólicos dos chás verdes das cultivares *C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori' foram similares ao longo do período da colheita. Contudo, a análise de componentes principais permitiu inferir que essas cultivares apresentaram comportamento metabólico distintos durante a safra. Com isso, investigou-se a influência das condições climáticas sobre a composição química do chá verde dessas cultivares.

Os parâmetros avaliados foram os dados diários de temperatura máxima e mínima (°C), radiação solar (W/m^2), umidade relativa do ar (%) e precipitação acumulada (mm), relativos ao período de outubro de 2016 a abril de 2017. Os cinco parâmetros climáticos avaliados foram fornecidos pelo Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR).

Analisando-se o gráfico de temperaturas máxima, mínima e radiação solar foi possível inferir que os meses de novembro de 2016 a março de 2017 apresentaram as temperaturas máxima e mínima mais elevadas e, os maiores índices de radiação solar. Esses meses englobaram os dias mais quentes e ensolarados do período estudado. Por outro lado, os meses de outubro de 2016 e abril de 2017 apresentaram as menores temperaturas máxima e mínima média e, conseqüentemente, menor índice de radiação solar, o que confere a esses meses a presença de dias mais frios (GRÁFICO 1, p. 111).

Com relação aos parâmetros de precipitação e umidade relativa do ar (GRÁFICO 2, p. 111), pôde-se observar que os meses de outubro e janeiro apresentaram os maiores índice de precipitação, com uma alta umidade relativa

do ar. Em março houve o menor índice de precipitação acumulada, mas uma alta umidade relativa do ar.

GRÁFICO 1 - TEMPERATURAS MÁXIMA E MÍNIMA MÉDIAS E ÍNDICE DE RADIAÇÃO SOLAR DURANTE O PERÍODO DE SAFRA DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori').

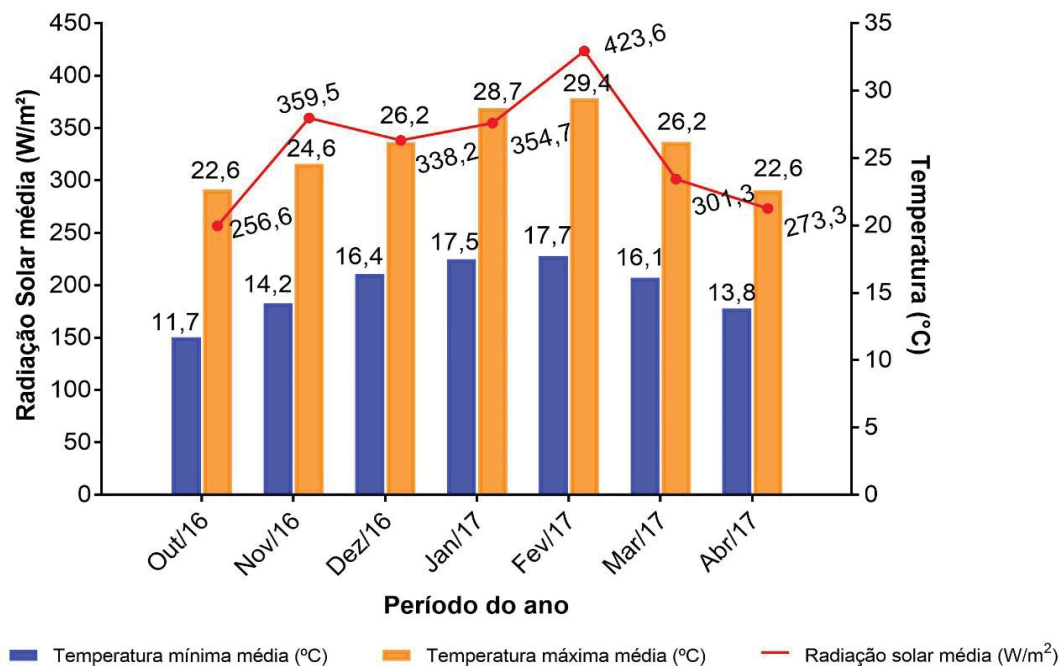
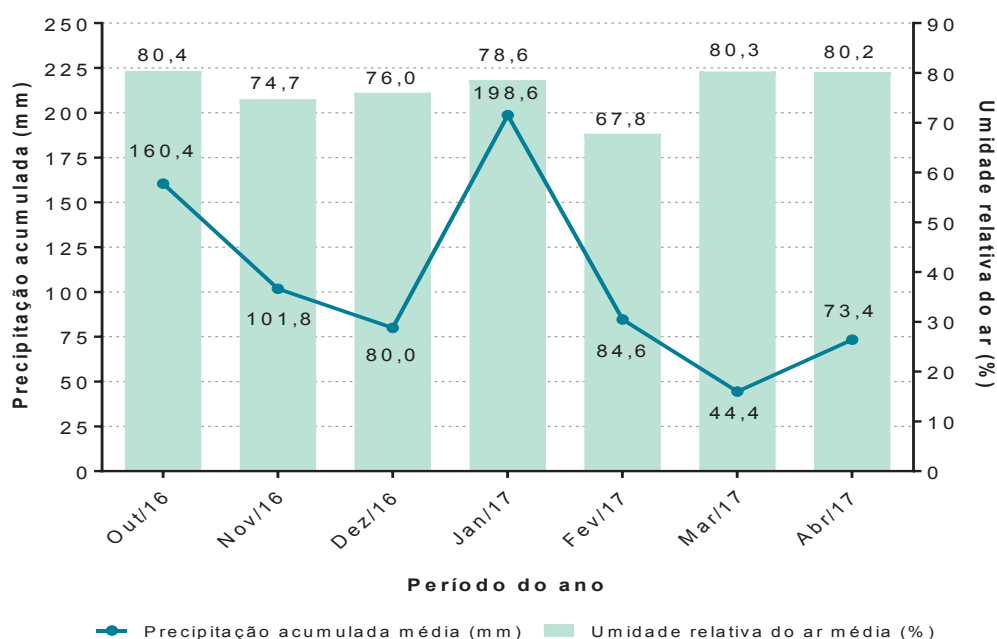


GRÁFICO 2 - PRECIPITAÇÃO ACUMULADA E UMIDADE RELATIVA DO AR MÉDIA DURANTE O PERÍODO DE SAFRA DOS CHÁS VERDES DAS CULTIVARES (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori').



O ácido linolênico, em termos de qualidade, é considerado um dos precursores dos compostos voláteis que conferem um aroma agradável ao chá verde (LIU et al., 2017; HO et al., 2015). Em relação ao chá verde da cultivar 'Yabukita', observou-se um aumento significativo do ácido linolênico no mês de outubro em relação aos meses de novembro, janeiro, março e abril. Além disso, uma redução significativa desse composto durante os meses de dezembro.

Para o chá verde da cultivar 'Yutakamidori', um aumento significativo do ácido linolênico foi observado no mês de novembro em relação a dezembro e março (FIGURA 66, p.115). Os meses de outubro e janeiro foram caracterizados pelo aumento do índice de precipitação. Esse aumento na quantidade de ácido linolênico pode estar associado ao sistema de defesa da planta frente à chuva e umidade. O excesso de umidade torna a planta mais susceptível ao ataque de fungos. Devido a isso, a planta aumenta a produção de ácidos graxos como o ácido linolênico para impermeabilizar as suas folhas, e se proteger dos fungos (GOTLIEB, 1982). Estudos envolvendo a avaliação do ácido linolênico em *C. sinensis* ainda não foram reportados.

A teanina confere ao chá verde aroma agradável e um sabor único denominado umami. Um aumento significativo do conteúdo da teanina foi observado no início da safra, mês de outubro, seguido de um decréscimo nos meses de novembro a fevereiro e, posteriormente, um aumento em março e abril em ambas as cultivares de chá verde ('Yabukita' e 'Yutakamidori') (FIGURA 66, p. 115). Contudo, a cultivar 'Yabukita' apresentou um aumento acentuado na concentração de teanina em abril, final da safra em relação ao mesmo mês do chá verde da cultivar 'Yutakamidori'.

Esse comportamento pode estar relacionado ao mês de menor índice de radiação solar médio (outubro, março e abril). Essa tendência foi observada por Ohta e Harada (2010). Segundo os autores, as folhas de *C. sinensis* quando cultivadas em condição de sombra apresentaram maiores quantidades de teanina e baixa quantidade de catequinas, quando comparadas com aquelas que cresceram em condição de cultivo sob pleno sol. De acordo com Ku et al. (2010), o aumento da concentração de teanina sob condições de tratamento de sombra pode estar relacionado ao aumento da assimilação do nitrogênio, e à redução do catabolismo desse aminoácido sob o cultivo sombreado.

A diminuição da concentração de teanina em ambas as cultivares no período de novembro a fevereiro pode ser justificada pelo aumento do índice de radiação solar e elevadas temperaturas nesses meses. O elevado índice de radiação solar sobre as folhas de *C. sinensis* pode ocasionar a degradação da teanina e, conseqüentemente, convertê-la às catequinas (TARACHIWIN et al., 2007). O aumento significativo da teanina no mês de abril, principalmente para o chá verde da cultivar 'Yabukita', pode estar relacionado ao decréscimo do índice de radiação solar e da precipitação no término da safra.

Os flavanóis, *epi*-catequina, galato de *epi*-catequina, galato de *epi*-galocatequina e *epi*-galocatequina, são responsáveis pelo sabor adstringente do chá verde. Nesse estudo, para o chá verde da cultivar 'Yabukita' observou-se que as concentrações de *epi*-catequina durante os meses de outubro a janeiro e abril são mais elevadas em comparação com as concentrações no mesmo período para a cultivar 'Yutakamidori'. Por outro lado, houve um decréscimo significativo da concentração da *epi*-catequina no mês de fevereiro.

Isso pode estar relacionado ao elevado índice de radiação solar durante esse mês (FIGURA 66, p.115). Essa tendência também foi observada por Zheng et al. (2008). Estes autores reportaram o efeito da exposição solar sobre duas cultivares de chá verde, 'Yulan' e 'Fudingdabai'. Segundo eles, os raios UV-B estimulam as expressões dos genes relacionados às enzimas envolvidas na biossíntese das catequinas, resultando na elevação do acúmulo das catequinas do chá verde durante o início do estágio de irradiação UV-B. Entretanto, a longa exposição a elevados índices dessa irradiação tende a danificar o tecido vegetal resultando na diminuição do nível das catequinas.

Para a cultivar 'Yutakamidori' (FIGURA 66, p. 115), pode ser observado um aumento significativo de *epi*-catequina em março, e uma diminuição significativa em abril. Isso pode ser explicado pelos menores índices de precipitação durante esses meses e elevado índice de radiação solar. Essas condições aumentam o estímulo da produção de flavonóis (WANG et al., 2011; ZHENG et al., 2008). Por outro lado, Lee et al. (2010) relataram que amostras de chá verde expostas a temperaturas baixas, curta exposição solar e baixo índice de precipitação apresentaram diminuição dos compostos isoleucina, alanina, valina, *epi*-catequina, *epi*-galocatequina, galato de *epi*-catequina, e cafeína.

A cafeína é um metabólito responsável pelo sabor amargo do chá verde, e é considerado um marcador de qualidade juntamente com a teanina e as catequinas. Comparando-se as concentrações de cafeína no chá verde de ambas as cultivares, pôde-se inferir que o chá verde 'Yabukita' apresentou menores concentrações de cafeína. Contudo, nos chás verdes de ambas as cultivares, observou-se um aumento significativo da cafeína no mês de dezembro e um decréscimo significativo do mês de fevereiro, março e abril em relação aos meses de outubro, novembro, dezembro e janeiro.

Similarmente, o chá verde da cultivar 'Yutakamidori', apresentou um aumento significativo da cafeína no mês de dezembro e um decréscimo significativo nos demais meses da safra (FIGURA 66, p. 115). O mês de dezembro caracterizou-se pela ocorrência de um aumento gradativo da temperatura e índice de radiação solar, bem como, relativo aumento do índice de precipitação. E, no mês de março houve o predomínio de dias menos chuvosos e quentes. De acordo com Lee et al (2010), a ocorrência de chuvas pode ser um fator estimulante para a biossíntese da cafeína. No entanto, até agora, a relação direta entre catequinas, cafeína e fatores climáticos não foi reportada.

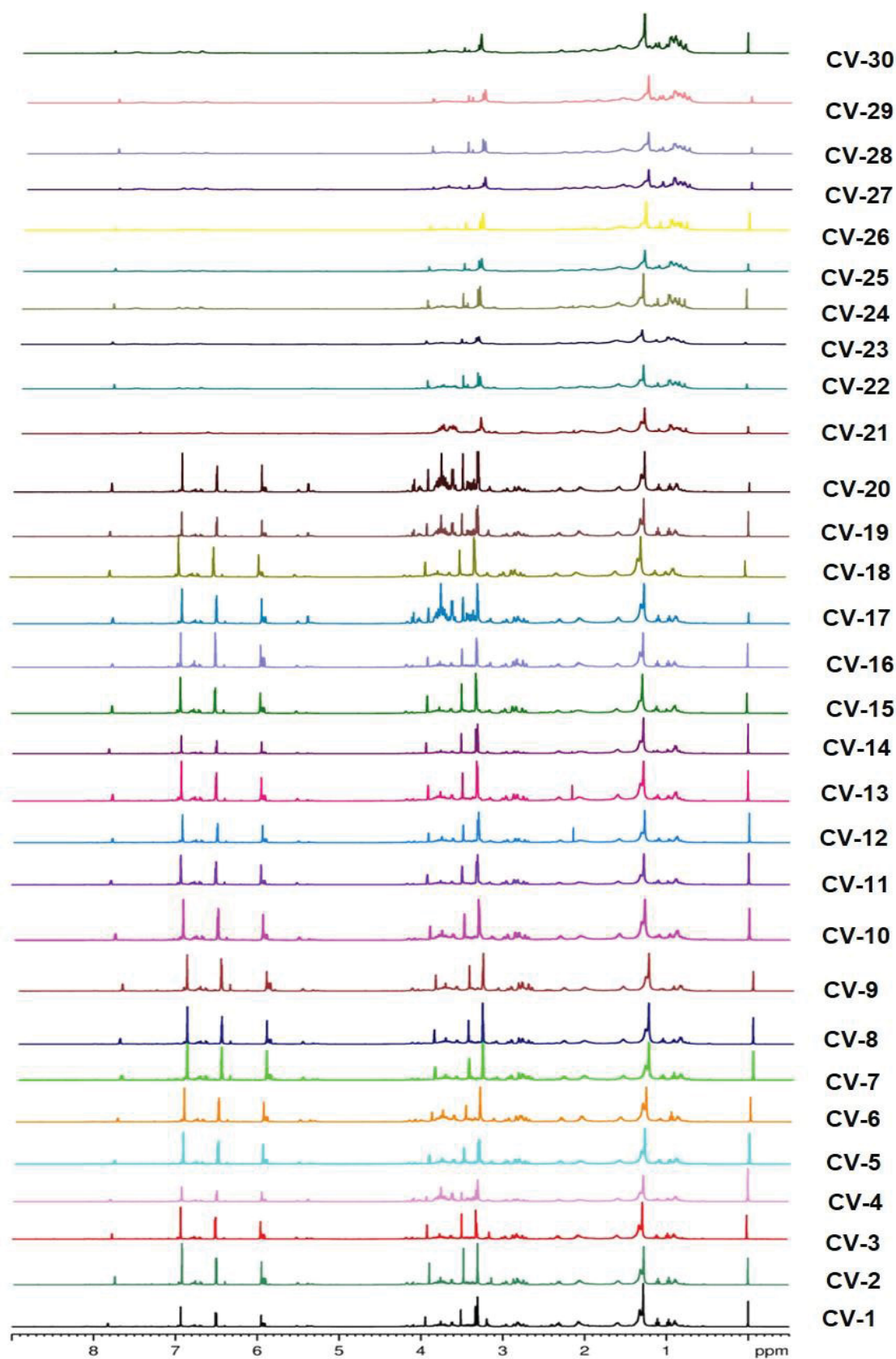
4.10 ANÁLISE DO *FINGERPRINTING* METABÓLICO DOS CHÁS VERDES COMERCIAIS POR RMN HR-MAS DE ^1H E RMN EM SOLUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico (RMN HR-MAS) é uma técnica que vem sendo utilizada no controle de qualidade de plantas. Através do perfil espectral obtido por RMN HR-MAS de ^1H é possível obter informações relevantes a partir do *fingerprinting* da espécie vegetal. A metodologia de *fingerprinting* por RMN também conhecida como *fingerprinting* metabólico é considerada eficiente para a verificação da autenticidade das plantas utilizadas na produção de chás e fitoterápicos (SIMMLER et al., 2018).

Desse modo, o *fingerprinting* metabólico das amostras de chás verdes comerciais foi obtido através da técnica de RMN HR-MAS de ^1H . Para isso, o chá verde obtido a partir das folhas dos brotos de *C. sinensis* 'Yabukita' (CV-1) foi utilizado como referência. O espectro de RMN HR-MAS de ^1H (FIGURA 67, p.117) do chá verde, CV-1, permitiu observar os sinais de hidrogênios típicos dos compostos alifáticos, aminoácidos, açúcares, flavanóis e xantinas comumente encontrados no chá verde (KELLOG el al., 2017; LEE et al; 2010).

Analisando-se os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foi possível observar que as amostras comerciais de chás verdes (CV-2 a CV-20) apresentaram *fingerprinting* metabólico semelhante ao chá verde utilizado como referência (CV-1) (FIGURA 67, p. 117) indicando que eles apresentaram a composição química semelhante. Esses resultados mostram que esses chás estão sendo comercializados a partir da espécie *C. sinensis*, e, portanto, estão de acordo com a regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005).

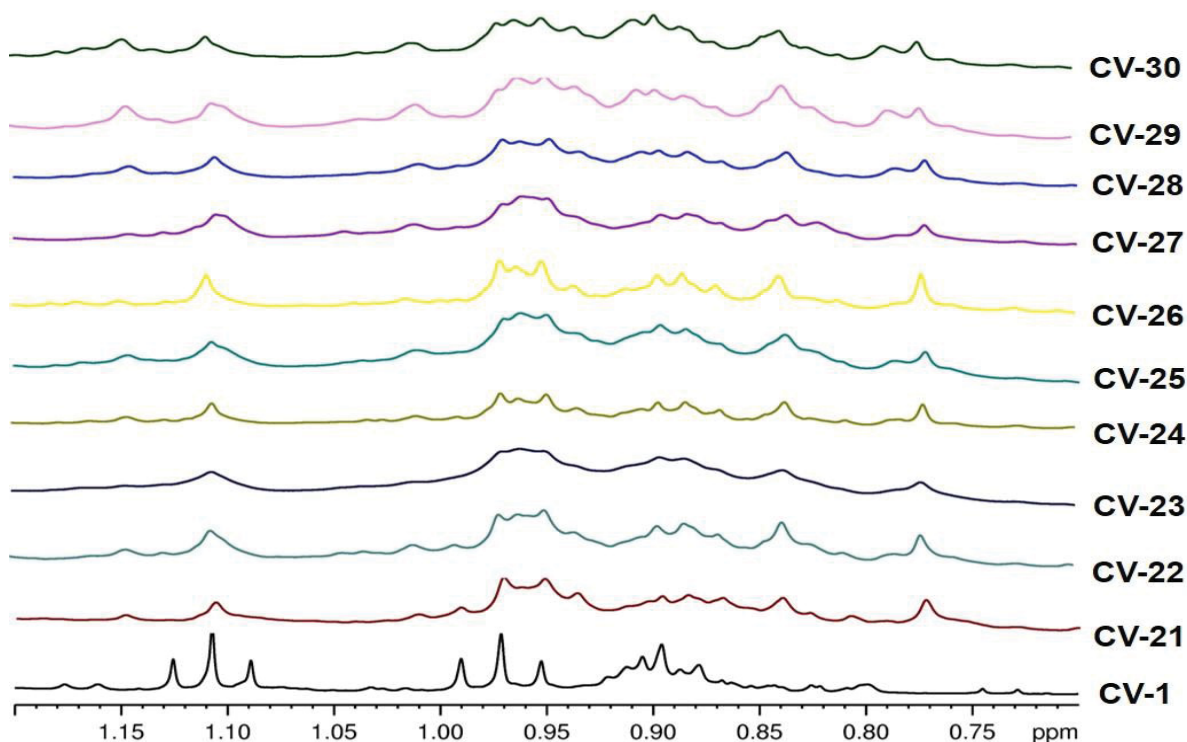
FIGURA 67 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DE AMOSTRAS DE CHÁ VERDE COMERCIALIZADOS NO BRASIL (CV-2 A CV-30) EM COMPARAÇÃO AO CHÁ VERDE REFERENCIAL CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') (400 MHz, CD_3OD)



Em contrapartida, os chás comerciais denominados (CV-21 a CV-30) apresentaram perfis espectrais de RMN HR-MAS de ^1H distintos do chá verde de referência (CV-1) (FIGURA 68). Analisando-se o espectro de RMN HR-MAS de ^1H com a ampliação da região espectral entre δ 1,20 – 0,70 das amostras CV-21 a CV-30 foi observada a ausência do sinal do hidrogênio em δ_{H} 1,11 (t , $J = 7,3$ Hz, H-8) característico da teanina, composto considerado como um dos marcadores químicos do chá verde (FIGURA 68). A teanina é um aminoácido não proteico que tem como precursores o ácido glutâmico e a etilamina. Essa substância é encontrada abundantemente no chá verde, e é responsável pelo seu sabor característico conhecido como umami (LEE et al., 2010).

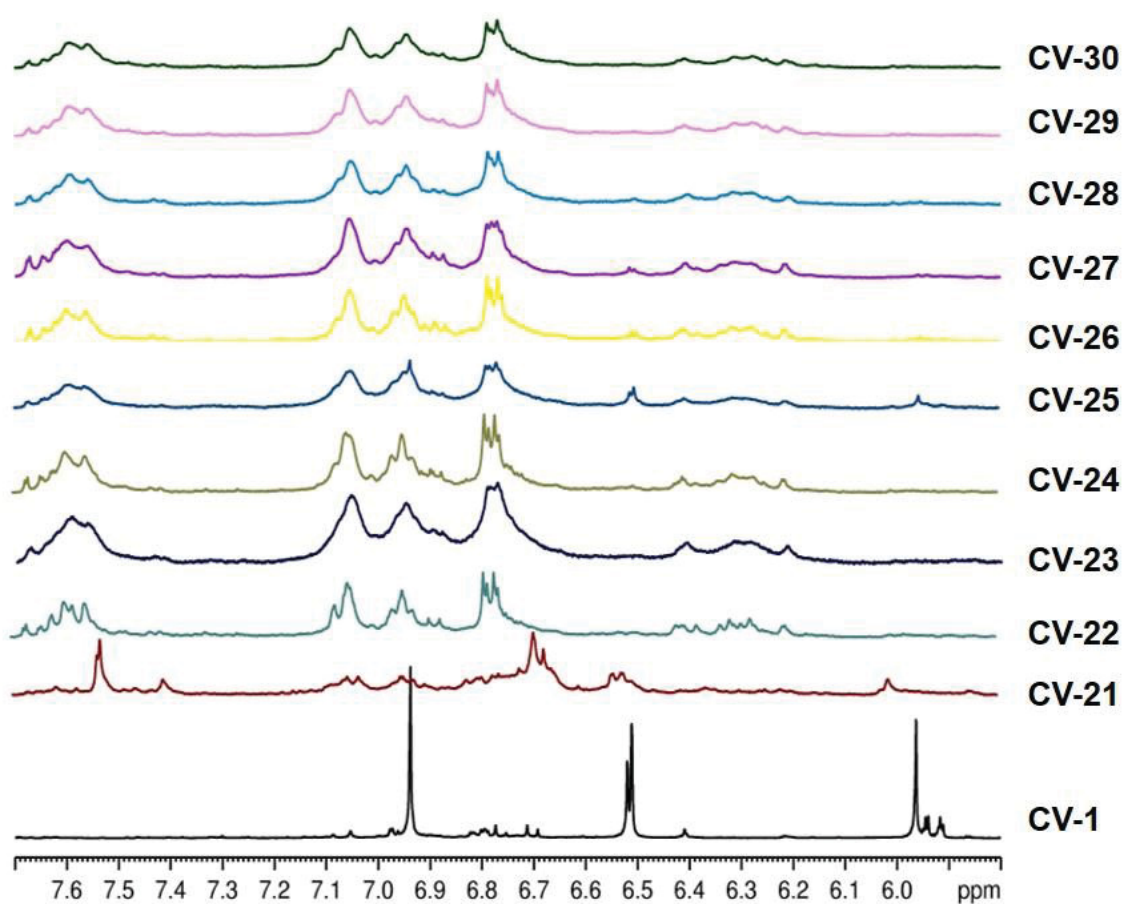
Segundo Cheng et al. (2017), o ácido glutâmico é encontrado em muitas plantas, mas apenas as variedades de *C. sinensis* produzem a etilamina, o que explicaria a produção específica da teanina. Dessa forma, pôde-se inferir que as amostras que não apresentaram o sinal de hidrogênio da teanina (δ_{H} 1,11, t) não foram obtidas a partir da espécie *C. sinensis*.

FIGURA 68 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,20 – 0,70 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO AOS CHÁS COMERCIAIS CV-21 AO CV-30.



Além da região dos aminoácidos, a região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos (FIGURA 69) mostrou-se relevante para identificar as amostras de chás verde provenientes da espécie *C. sinensis*. A análise do espectro de RMN HR-MAS de ^1H do chá verde referencial (CV-1) apresentou na região entre δ_{H} 7,75 - 5,80 sinais típicos dos flavanoides do tipo flavan-3-óis, que também são marcadores químicos dessa espécie. Contudo, diferentemente das amostras dos chás comerciais (CV-2 a CV-20), as amostras CV-21 a CV-30 apresentaram nessa região entre δ_{H} 7,75 - 6,00 sinais de hidrogênios típicos de derivados do ácido cafeico (FREITAS et al., 2018).

FIGURA 69 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,75-6,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H DO CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO AOS CHÁS COMERCIAIS CV-21 AO CV-30.



Dentre as amostras de chá comerciais (CV-21 a CV-30) analisadas, o chá (CV-24), apresentou no rótulo a denominação “chá verde (*Ilex paraguariensis*)”. A análise dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H (FIGURA 70, p. 121) permitiu observar que a amostra CV-24 apresentou um *fingerprinting* metabólico distinto do chá verde referencial (CV-1). Vale ressaltar que a espécie *I. paraguariensis* é indicada pela ANVISA para a preparação de erva-mate (BRASIL, 2005).

Diante disso, análises de RMN HR-MAS de ^1H de amostras de erva-mate comerciais foram realizadas. A análise dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras do chá verde (CV-24) e erva-mate (EM-1) permitiu verificar que ambas as amostras apresentam *fingerprinting* metabólico semelhantes, principalmente, nas regiões entre δ_{H} 1,20-0,70 (FIGURA 70, p. 121) e δ_{H} 8,00-6,00 (FIGURA 70, p. 121).

A região entre δ_{H} 1,20 - 0,70 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H (FIGURAS 71, p. 121) do chá comercial (CV-24) apresentou a ausência do sinal da teanina (δ_{H} 1,11, *t*, *J* = 7,4 Hz), do ácido linolênico (δ_{H} 0,97, *t*, *J* = 7,5 Hz) e a presença de sinais típicos de outros ácidos graxos, corroborando com a similaridade desse chá com a amostra de erva-mate (EM-1). A região entre δ_{H} 8,00-6,00 foi caracterizada pelos sinais típicos do ácido cafeico e de seus derivados, metabólitos comumente encontrados na erva-mate (FIGURA 72, p.122) (KIM et al., 2010; FREITAS et al., 2018).

As espécies de *Ilex* são consideradas uma fonte de compostos fenólicos, principalmente, ácidos mono e dicafeoilquínicos, tais como: ácidos clorogênico, 4,5-dicafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico, bem como, cafeína e teobromina (KIM et al., 2010; FREITAS et al., 2018).

FIGURA 70 - ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE REFERENCIAL CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO COM O CHÁ COMERCIAL (CV-24) E A ERVA-MATE (EM-1)

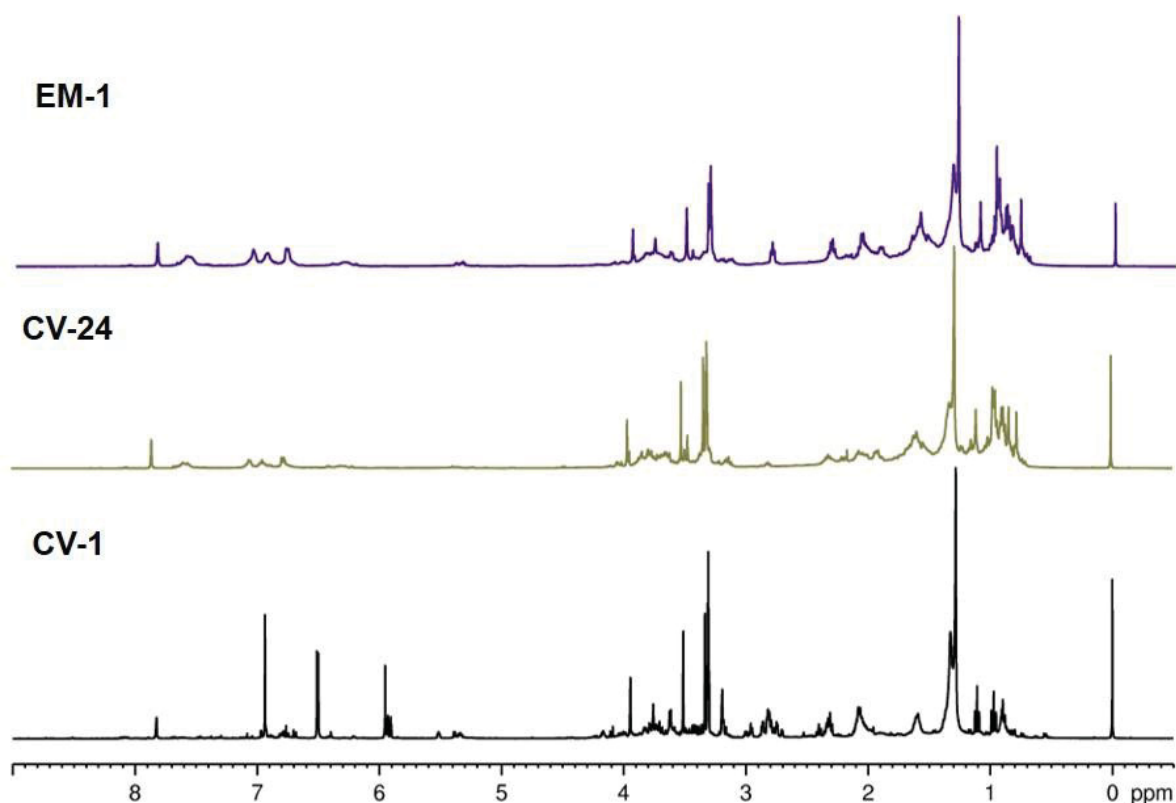


FIGURA 71 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 1,20 – 0,70 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita'). EM COMPARAÇÃO AO CHÁ COMERCIAL CV-24.

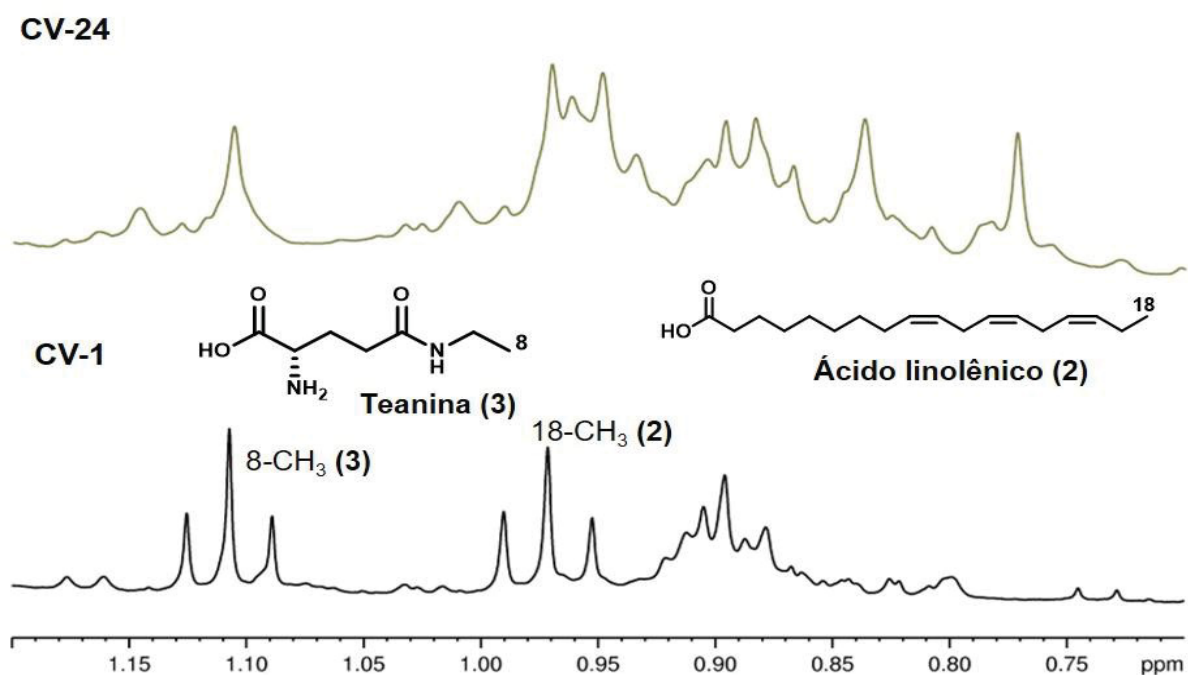
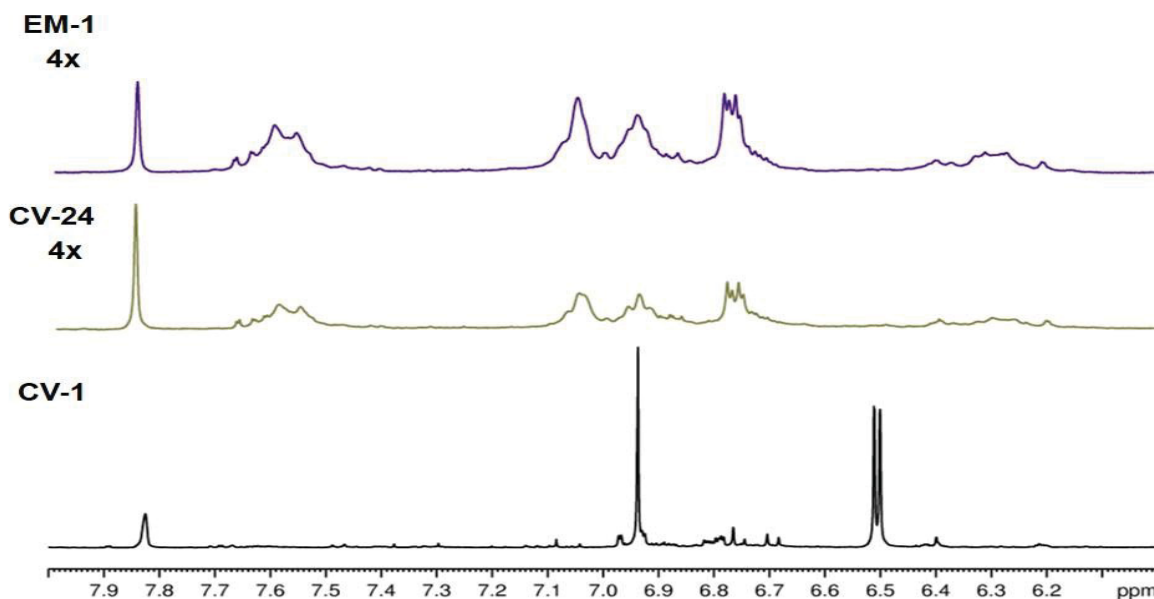


FIGURA 72 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 8,00-6,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE (CV-1) EM COMPARAÇÃO AO CHÁ COMERCIAL (CV-24) E A ERVA-MATE (EM-1).



A análise da região entre δ_{H} 4,40 - 3,00 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H do chá verde referencial (CV-1) em comparação com as amostras de chá verde comerciais CV-21 a CV-30 mostrou que esses chás apresentam três simpletos em δ_{H} 3,97, 3,52, e 3,34, característicos dos hidrogênios *N*-metílicos da cafeína (FIGURA 73, p. 123).

Pôde-se observar também, através do espectro de RMN HR-MAS de ^1H na região entre δ_{H} 4,40 - 3,00, que as amostras de chá verde CV-22 a CV-30 apresentaram dois simpletos minoritários em δ_{H} 3,95 e 3,47, característicos dos hidrogênios *N*-metílicos do composto químico teobromina. Comparando-se os espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de chá verde CV-1, CV-24 e erva-mate (EM-1), pôde-se verificar que diferentemente do chá verde referencial, as amostras CV-24 e EM-1 apresentaram sinais dos hidrogênios típicos do composto teobromina (FIGURA 74, p. 124).

FIGURA 73 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,40-3,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE CV-1 (*C. sinensis* 'Yabukita') EM COMPARAÇÃO AOS CHÁS COMERCIAIS CV-21 AO CV-30.

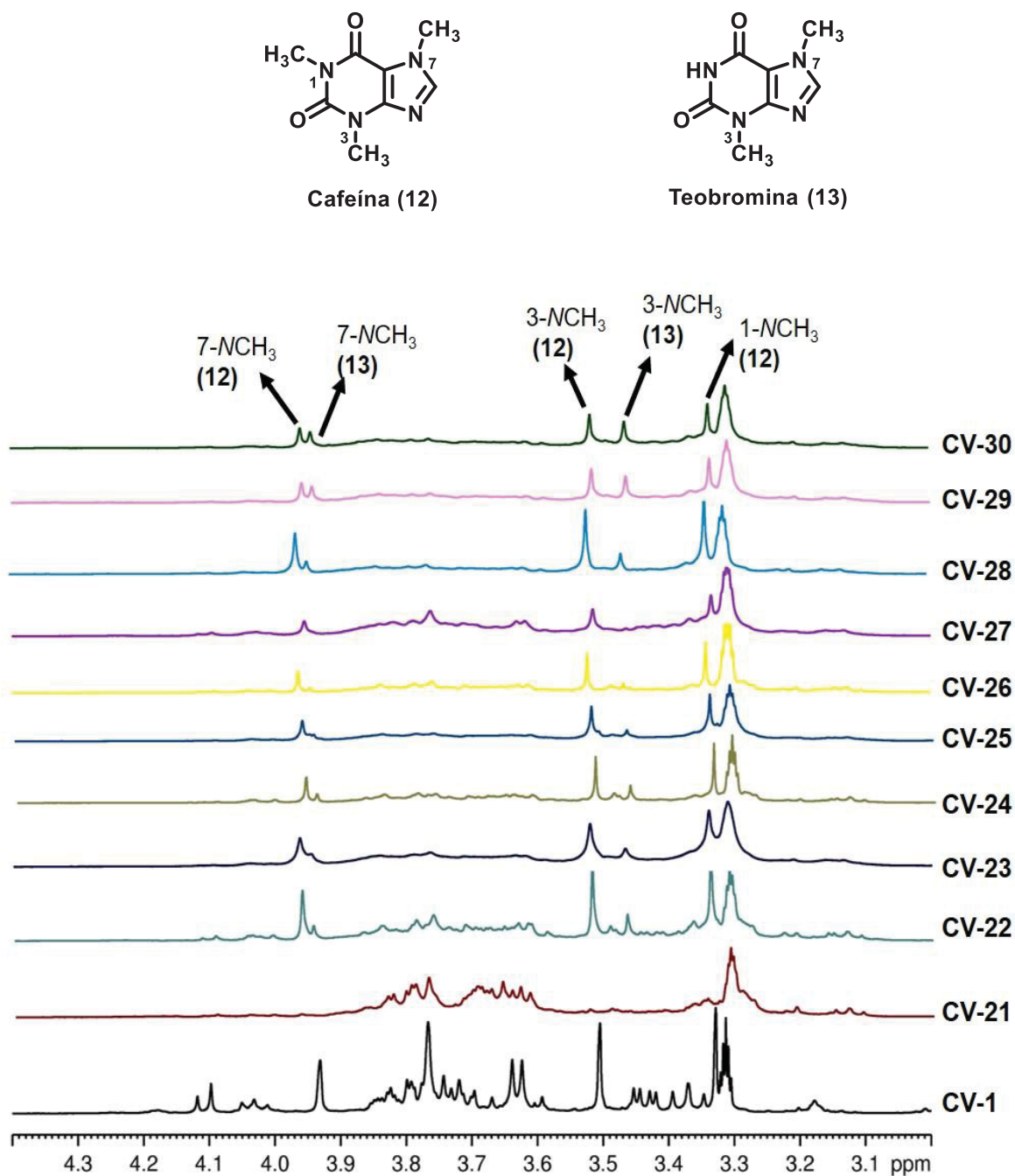
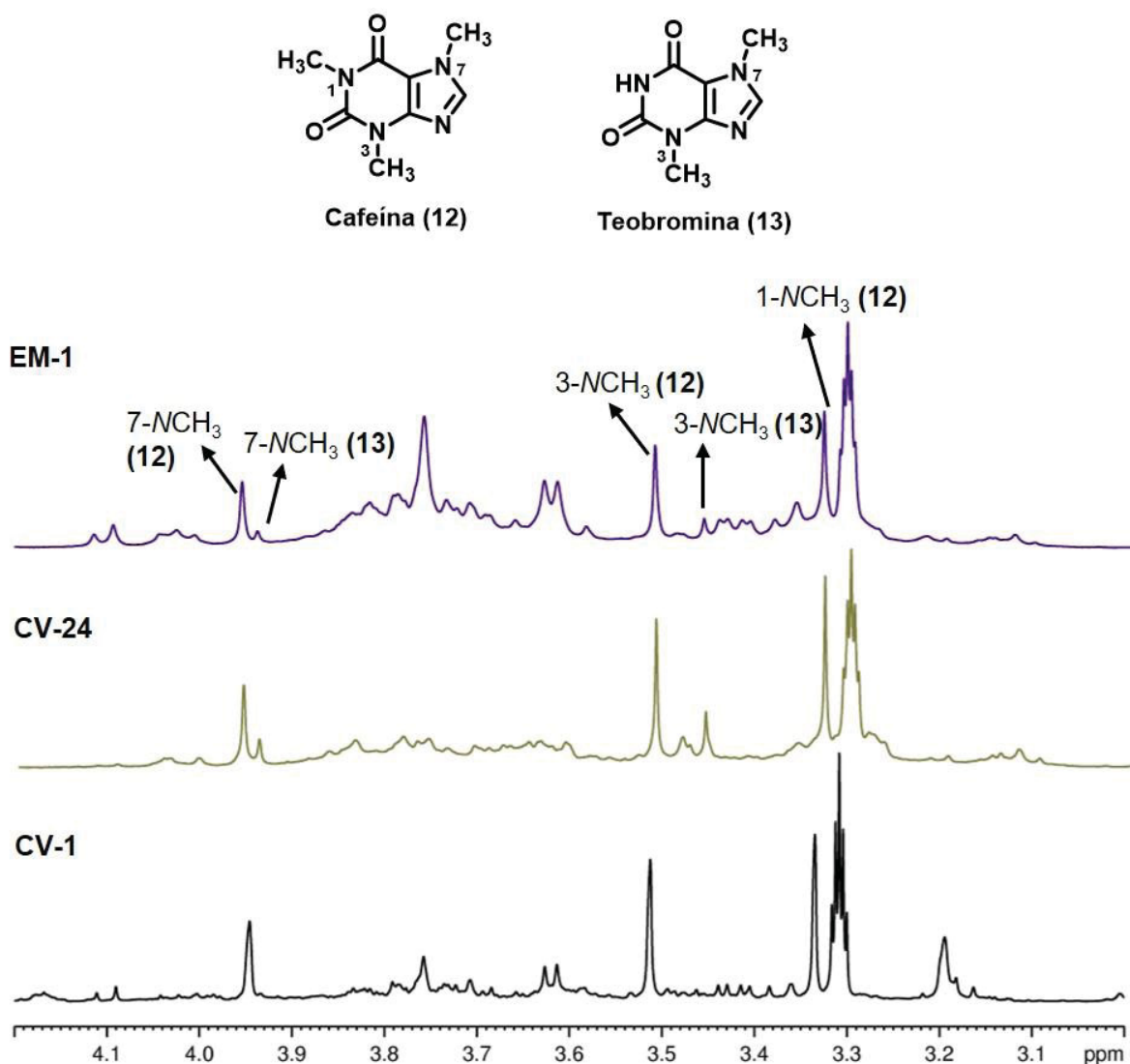


FIGURA 74 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,40-3,00 DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DO CHÁ VERDE (CV-1, AMOSTRA DE CHÁ VERDE REFERÊNCIA), CHÁ COMERCIAL (CV-24) E A ERVA-MATE (EM-1).



No intuito de identificar os demais compostos da amostra do chá comercial (CV-24) foi realizada a atribuição de sinais através de experimentos de RMN bidimensionais em solução. A identificação dos compostos foi confirmada por experimentos de RMN de ^1H , mapas de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC (FIGURAS 75,76, 77 e 78, p.125 e 126).

FIGURA 75 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE CV-24 (600 MHz, CD_3OD).

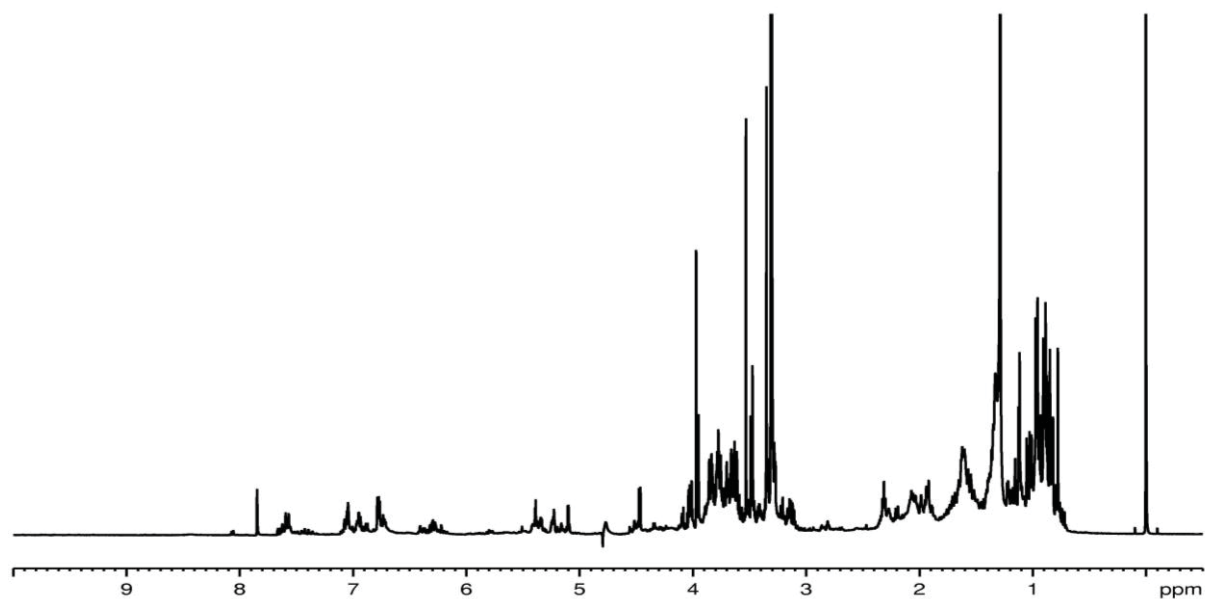


FIGURA 76 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.

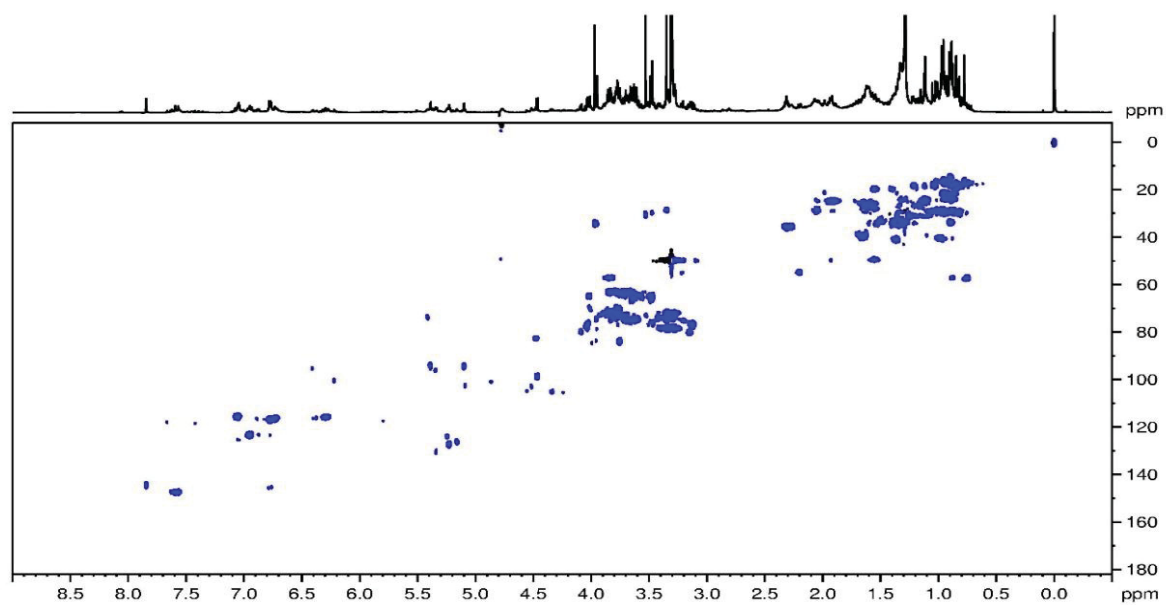
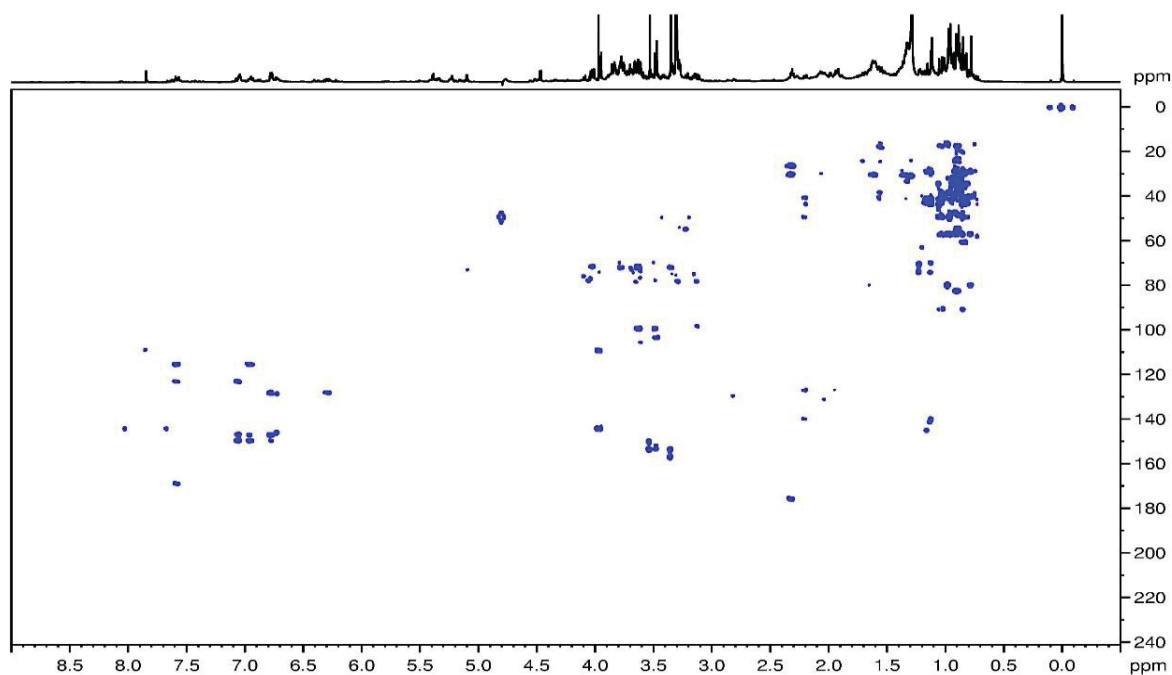


FIGURA 77 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.



A análise do mapa de correlação direta (^1H - ^{13}C) HSQC (FIGURA 78, p. 127) permitiu observar que os simpletos em δ_{H} 3,47 e 3,95 estão ligados aos carbonos em δ_{C} 29,5 e 34,3, respectivamente. A localização dos grupos *N*-metílicos foi confirmada pelo mapa de correlação à longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC (FIGURA 79, p. 127). O sinal em δ_{H} 3,47 (s) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 152,3 (C-2) e 153,00 (C-6), enquanto o sinal em δ_{H} 3,95 (s) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 109,5 (C-4) e 144,3 (C-8). Assim, os sinais em δ_{H} 3,47 e 3,95 foram atribuídos aos grupos 3 e 7 *N*-metílicos, respectivamente. De acordo com os mapas de correlação (^1H - ^{13}C) HSQC e (^1H - ^{13}C) HMBC foi identificada a teobromina nas amostras de chá verde CV-24 e EM-1.

FIGURA 78 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,10 - 3,33 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA (^1H - ^{13}C) HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.

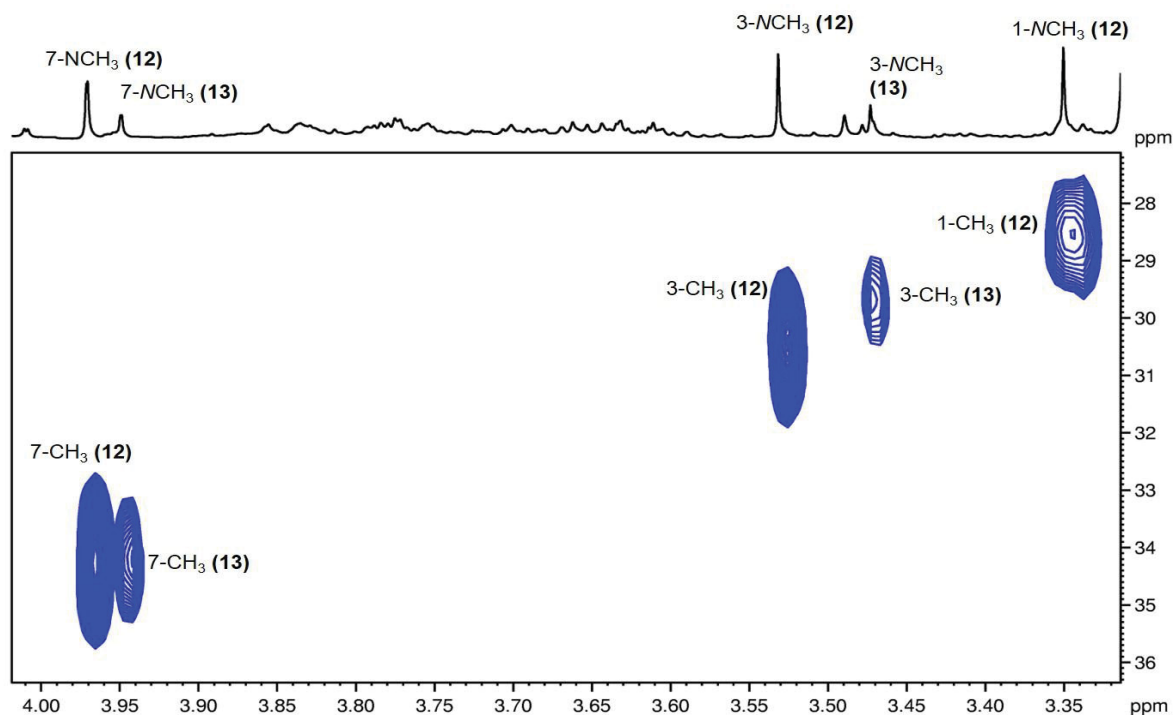
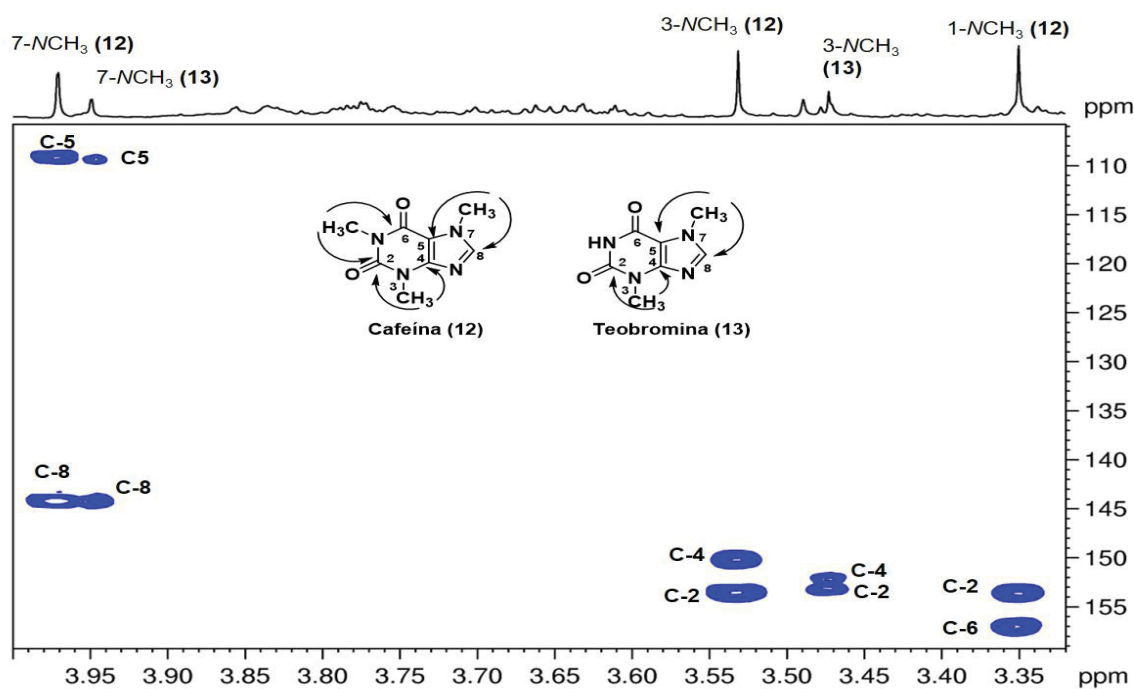


FIGURA 79 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 4,10-3,33 DO MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA (^1H - ^{13}C) HMBC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.



A análise da região entre δ_H 7,70 – 6,00 do espectro de RMN de 1H de CV-24 (FIGURA 80) apresentou dois dupletos característicos de uma ligação dupla *trans* em δ_H 7,57 e 6,28 ($d, J = 16,0$ Hz, cada). Esses sinais no mapa de correlação direta (HSQC) estão correlacionados aos carbonos em δ_C 147,5 (C-7) e 116,0 (C-8) (FIGURA 81, p. 129). No mapa de correlação a longa distância (HMBC), o sinal em 6,28 correlacionou com o carbono em δ_C 147,5 (C-7) e 170,0 (C-9), e o sinal em δ_H 7,57 correlacionou com os sinais em δ_C 115,3 (C-2), 123,4 (C-1) e 170,0 (C-9).

Além disso, observou-se sinais em δ_H 7,07 ($d, J = 2,0$ Hz), 6,95 ($d, J = 8,2$ e 2,0 Hz) e 6,77 ($d, J = 8,2$ Hz), que correlacionaram diretamente com os carbonos em δ_C 115,4, 123,4 e 116,8, respectivamente (FIGURA 81, p. 129). Analisando-se o mapa de correlação a longa distância (HMBC), verificou-se que o sinal em δ_H 7,07 correlacionou com os carbonos em δ_C 123,4 (C-6), 146,8 (C-3) e 149,5 (C-4). O sinal em δ_H 6,95 correlacionou com os carbonos em δ_C 115,4 (C-2), 146,8 (C-3) e 149,5 (C-4), e o sinal em δ_H 6,77 apresentou correlações com os carbonos em 128,3 (C-1), 146,8 (C-3) e 149,5 (C-4). De acordo com estes dados foi identificado o ácido cafeico nas amostras de chá comercial CV-24 e EM-1 (FIGURA 83 e TABELA 13, p. 130)

FIGURA 80 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,70-6,00 DO ESPECTRO DE RMN DE 1H DO CHÁ CV-24 (600 MHz, CD_3OD).

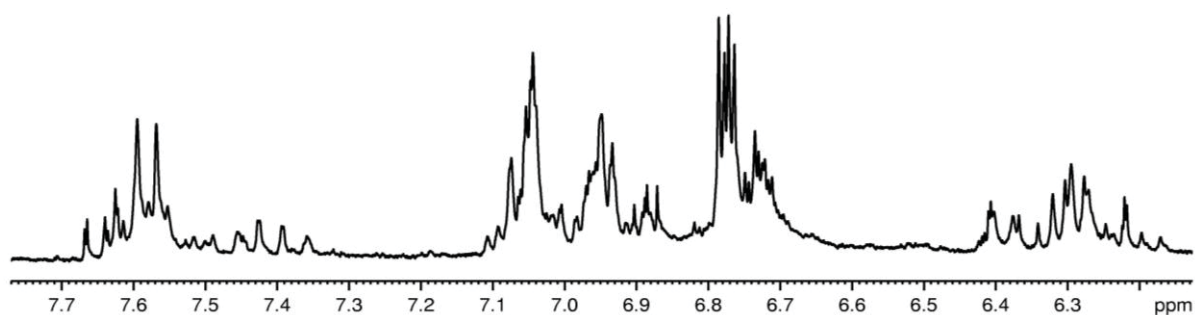


FIGURA 81 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,70- 6,00 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.

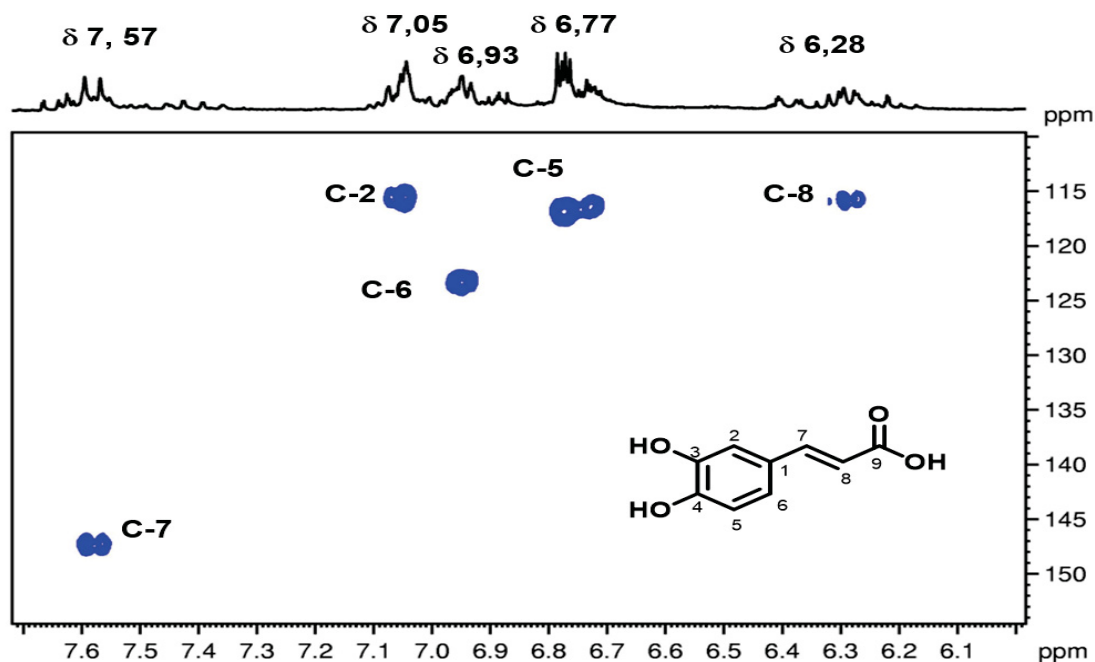


FIGURA 82 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 7,70- 6,00 DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA HSQC (^1H : 600 MHz E ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD) DA AMOSTRA CV-24.

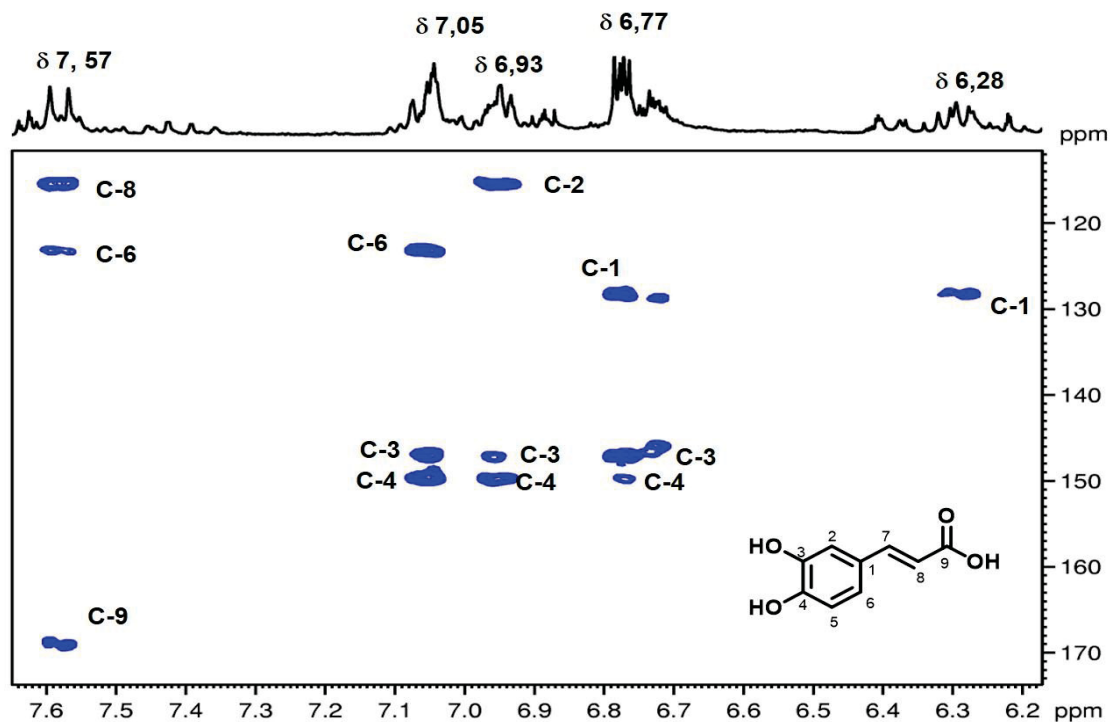


FIGURA 83 - ESTRUTURA DO ÁCIDO CAFEICO.

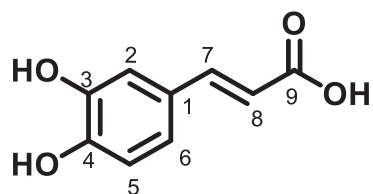


TABELA 14. DADOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA ÁCIDO CAFEICO.

Posição	Ácido cafeico (experimental)			Ácido cafeico	
	$\delta^{1\text{H}}$; mult. ^a (J em Hz)	$\delta^{13\text{C}}$ ^{a,b}	$L\text{-}D J_{\text{H,C}}$ ^{a,b}	$\delta^{1\text{H}}$ mult. ^c (J em Hz)	$\delta^{13\text{C}}$ ^c
1		128,3			127,9
2	7,04 <i>d</i> (2,0)	115,4	3, 4 e 6	7,03 <i>d</i> (2,1)	115,0
3		146,8			146,7
4		149,5			149,4
5	6,77 <i>d</i> (8,2)	116,8	1, 3 e 4	6,77 <i>d</i> (8,4)	116,5
6	6,95 <i>dd</i> (8,2 e 2,0)	123,4		6,92 <i>dd</i> (8,4 e 2,1)	122,8
7	7,57 <i>d</i> (16,0)	147,5	2, 6 e 9	7,51 <i>d</i> (16,1)	146,8
8	6,28 <i>d</i> (16,0)	116,0	7 e 9	6,22 <i>d</i> (16,1)	115,9
9		170,0			171,6

^a Experimento de RMN realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como referência em δ 0,00. ^b Dados de ^{13}C determinados por experimentos de RMN uma ligação (^1H - ^{13}C) HSQC e a longa distância (^1H - ^{13}C) HMBC. ^c Dados de RMN obtidos HONG et al., 2016 (700 MHz para ^1H e 175 MHz em CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm

As espécies *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Teobroma cacao* e *Coffea arabica* utilizadas na produção do chá verde, erva-mate, chocolate e café, respectivamente, podem apresentar em sua composição química as xantinas cafeína, teobromina e teofilina (FREITAS et al., 2018; KIM et al., 2010; ASHIHARA; KATO; CROZIER, 2010).

Segundo Kim et al. (2010), as quantidades de cafeína, teobromina e teofilina podem variar de acordo com a espécie de *Ilex* utilizada no preparo da erva-mate. Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram inferir que as amostras comercializadas como chás verdes comerciais (CV-21 a CV-30) devem estar sendo produzidas a partir das folhas de *Ilex paraguariensis*.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 277 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as folhas e talos da espécie vegetal *Camellia sinensis* (L.) Kuntze são destinadas ao preparo de chá verde, branco ou preto. Por outro lado, a erva-mate é caracterizada como um produto constituído das folhas e dos ramos da espécie *Ilex paraguariensis* St. Hill, os quais são submetidas ao processo de secagem e fragmentação para a obtenção do “chimarrão” ou “tererê”. Nesse contexto, o *fingerprinting* metabólico obtido através da técnica de RMN HR-MAS de ¹H permitiu determinar que os chás verdes (CV-21 a CV-30) estão em desacordo com a legislação vigente (BRASIL, 2005b) por não serem produzidos a partir da espécie *C. sinensis*.

Dentre as amostras de chá verde comerciais analisadas nesse trabalho não foi observada a mistura de outras ervas no preparo do chá verde. Contudo, visando ampliar a utilização do *fingerprinting* metabólico via RMN HR-MAS de ¹H, uma mistura 1:1 da amostra de chá verde CV-1 (referencial) e erva-mate foi preparada (FIGURAS 84-86, p. 132 e 133).

A análise do espectro de RMN HR-MAS de ¹H permitiu observar distintamente os sinais da teanina, ácido linolênico, catequinas e da cafeína comumente encontrados no chá verde, bem como, os sinais típicos dos derivados do ácido cafeico, que são encontrados na erva-mate. Isso mostra que casos de adulteração de amostras de chá verde com erva-mate podem ser identificados através do espectro de RMN HR-MAS.

FIGURA 84 - ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS AMOSTRAS DE CHÁ VERDE (CV-1), ERVA-MATE (EM-1) E DA MISTURA DE CHÁ VERDE E ERVA-MATE.

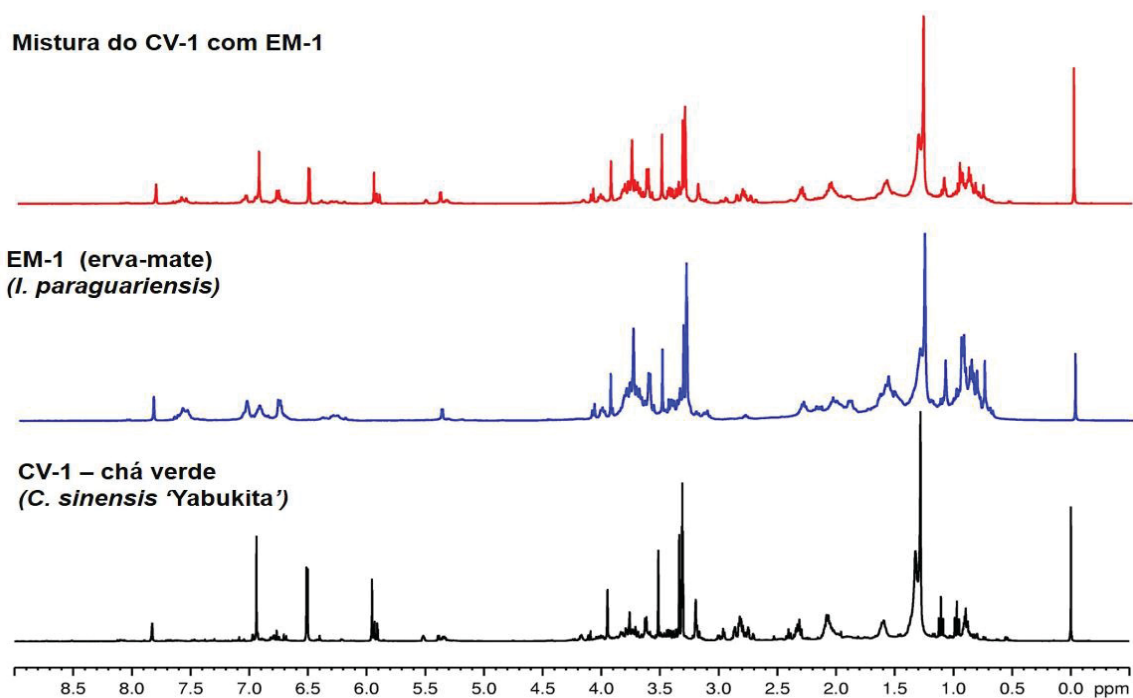


FIGURA 85 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 3,10 – 0,50 DO ESPECTRO DE RMN HR-MAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS AMOSTRAS DE VERDE (CV-1), ERVA-MATE (EM-1) E DA MISTURA DE CHÁ VERDE E ERVA-MATE.

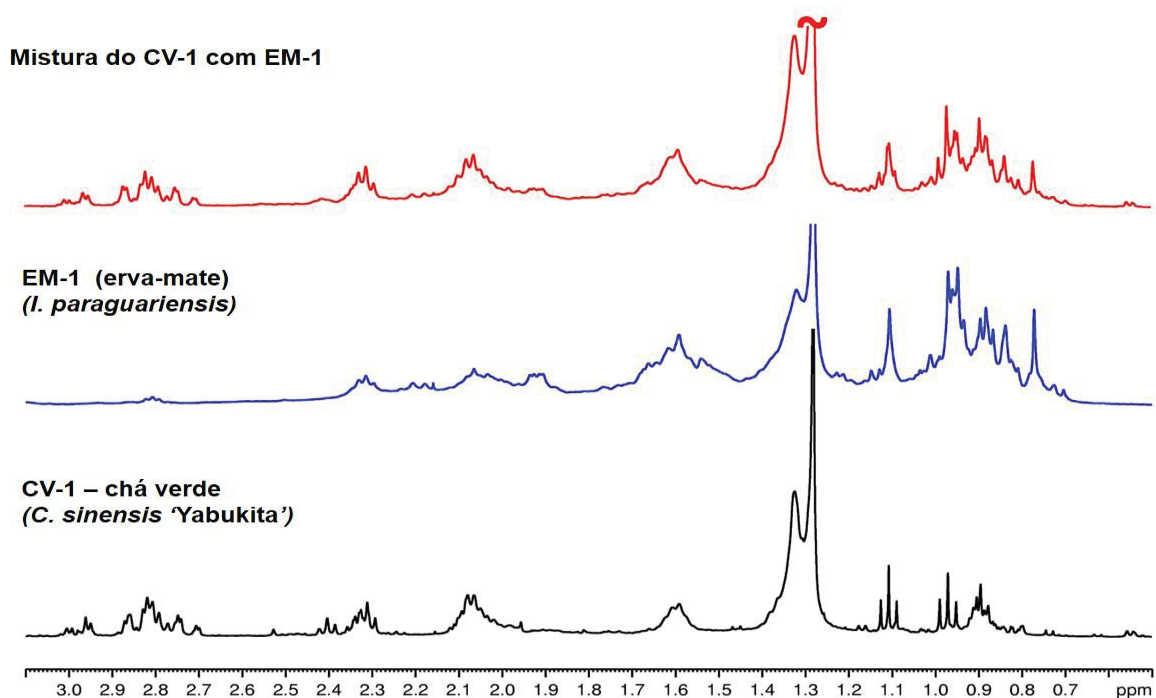
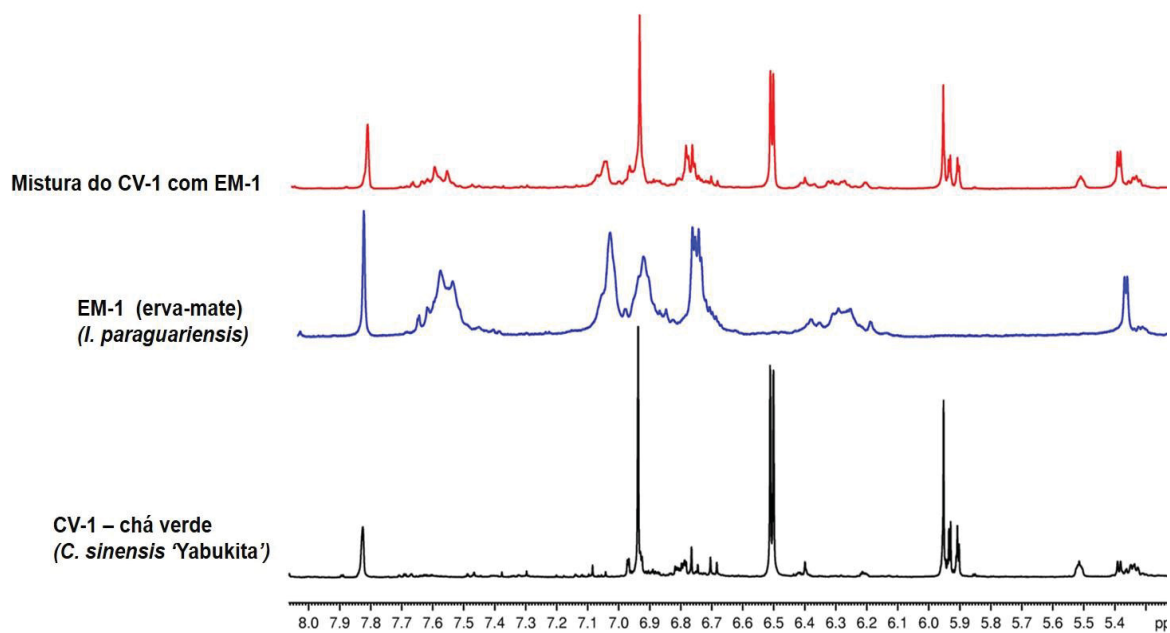


FIGURA 86 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ 8,10 – 5,17 DO ESPECTRO DE RMN HRMAS DE ^1H (400 MHz, CD_3OD) DAS AMOSTRAS DE VERDE (CV-1), ERVA-MATE (EM-1) E DA MISTURA DE CHÁ VERDE E ERVA-MATE.



5. CONCLUSÃO

A técnica de RMN HR-MAS de ^1H mostrou-se uma alternativa eficiente para o monitoramento da composição química (catequinas, cafeína, aminoácidos e ácidos graxos) das cultivares de chá verde (*C. sinensis* 'Yabukita' e *C. sinensis* 'Yutakamidori'), sob a influência dos parâmetros climáticos avaliados ao longo do período da safra, através da análise direta do material vegetal, utilizando o mínimo preparo de amostra e solvente.

A PCA das amostras das cultivares de chá verde permitiu observar que essas se discriminaram entre si durante o período da safra avaliado. Os principais constituintes químicos responsáveis pela discriminação, até então identificados foram: ácido linolênico, teanina, galato de *epi*-galocatequina, galato de *epi*-catequina, *epi*-catequina e cafeína. Estes compostos são indicadores de qualidade do chá verde.

Além disso, a PCA dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , em conjunto com os parâmetros climáticos, permitiu inferir que a composição química de ambas as cultivares de chás verdes foi influenciada durante o período da safra pelos fatores: temperatura, radiação solar, umidade relativa do ar e precipitação, conforme reportado na literatura.

Os dados de RMN HR-MAS de ^1H para ambas as cultivares, permitiu inferir que os meses mais chuvosos causaram elevada concentração de ácido linolênico, o que está relacionado ao mecanismo de defesa da planta a ataques fúngicos. A elevada concentração de teanina ocorreu nos meses chuvosos e com temperaturas baixas, e o seu decréscimo nos meses mais quentes, principalmente para a cultivar 'Yabukita'.

A *epi*-catequina apresentou um decréscimo da concentração relacionada ao alto índice de radiação solar e baixa precipitação, indicando susceptibilidade à excessiva taxa de irradiação UV-B. Entretanto, as concentrações de *epi*-catequina na cultivar 'Yabukita' foram superiores às aquelas na cultivar 'Yutakamidori'. A cafeína apresentou elevada concentração, principalmente na cultivar 'Yutakamidori', no período pouco chuvoso a chuvoso, com temperaturas máximas intermediárias. As cultivares 'Yabukita' e 'Yutakamidori' demonstraram mecanismos similares aos estímulos dos parâmetros climáticos. No entanto, a cultivar Yabukita mostrou-se mais adaptada às variações de

temperatura e pluviosidade, e exibiu elevados índices de teanina e *epi*-catequina e baixo teor de cafeína.

Os perfis metabólicos das duas cultivares ('Yabukita' e 'Yutakamidori') mostraram-se dependentes dos parâmetros ambientais como temperatura, radiação solar, precipitação e umidade relativa do ar. Diante disso, o monitoramento da composição química do chá verde, atrelada aos parâmetros climáticos ao longo da safra, torna-se uma estratégia viável para o estabelecimento de padrões de qualidade.

A metodologia utilizando o *fingerprinting* metabólico por RMN HR-MAS de ^1H mostrou-se eficiente para a análise das amostras comerciais de chá verde. A maioria dos chás verdes comerciais analisados apresentou perfil espectral semelhante ao dos chás verdes produzidos a partir das folhas de *C. sinensis*. Contudo, algumas marcas de chá verde apresentaram perfil espectral distinto do obtido a partir de amostras de *C. sinensis*, mas semelhante ao da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Esta planta tem em sua composição química ácidos graxos, açúcares, derivados do ácido cafeico e cafeína. Esses resultados mostram que determinados produtos vendidos no mercado como chá verde estão sendo processados a partir da espécie *Ilex paraguariensis*.

Dessa forma, torna-se evidente a importância de estabelecer um controle de qualidade mais rigoroso dos chás verdes comerciais, com a finalidade de garantir a segurança e eficácia dos produtos comercializados para a população.

6. REFERÊNCIAS

- AKOKA, S.; BARANTIN, L.; TRIERWEILER, M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. **Analytical Chemistry**, v. 71, p.2554-2557, 1999.
- AHMED, S.; STEPP, J. R. Green tea: the plants, processing, manufacturing and production. *In*: FREDDY, V. **Tea in Health and Disease Prevention**, 1 ed. Elsevier, p. 1612, 2012.
- AMARGIANITAKI M.; SPYROS, A. NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. **Chemical Biology Technology. Agricultural**, v.4, p.1-12, 2017.
- ASHIHARA H., KATO M., CROZIER A. **Distribution, Biosynthesis and Catabolism of Methylxanthines in Plants**. *In*: Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 200. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.
- ASHIRA, H. Occurrence, biosynthesis and metabolism of theanine (γ -glutamyl-L-ethylamide) in plants: a comprehensive review. **Natural Product Communication**, v. 10, p. 803-810, 2015.
- AUGUSTJIN, D.; ROY, U.; SCHADEWIJK, R.; GROOT, H. J. M.; ALILA, A. Metabolic profiling of intact *Arabidopsis thaliana* leaves during circadian cycle using ^1H high resolution magic angle spinning NMR. **Plos one**, v. 11, n.9, e0163258, 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0163258.
- BARANTIN, L.; LE PAPE, A.; AKOKA, S. A new method for absolute quantitation MRS metabolites. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 38, p. 179-182, 1997.
- BECKONERT, O.; COEN, M.; KEUN, H. C.; WANG, Y.; EBBELS, T. M. D.; HOLMES. E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. **Nature**, v. 5, p. 1019-1032, 2010.

- BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5-26, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 04 de Agosto de 2015. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, que “**dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos**”. Diário oficial da União, Poder Executivo, de 04 de agosto de 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás**. Diário oficial da União, Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.
- BRERETON, R. G. **Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester: Wiley, 2003, p. 489.
- CALGAROTTO, A. K.; MASO, V.; JUNIOR, G. C. F.; NOWILL, A. E.; FILHO, P. L.; VASSALLO, J.; SAAD, S. T. O. Antitumor activities of quercetin and green tea in xeno grafts of human leukemia HL60 cell, **Scientific Reports**, v.8, p. 1-7, 2018.
- CAMPO, G.; BERREGI, I.; CARACENA, J.; ZURIARRAIN, J. Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by ^1H NMR spectroscopy, **Talanta**, v. 81, p. 367-371, 2010.
- CAO, T.; ZHANG, X.; YANG, D.; WANG, Y-Q.; QIAO, Z-D.; HUANG, J-M.; ZHANG, P. Antioxidant effects of epigallocatechin-3-gallate on the aTC1-6 pancreatic alpha cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, p. 693-699, 2018.
- CARNEIRO, B. M.; BATISTA, M. N.; BRAGA, A. C. S.; NOGUEIRA, M. L.; RAHAL, P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. **Virology**, v. 496, p. 215, 2016.

- CHEN, J.; SINGER, S. **High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy**, in J. C. Lindon, J. K. Nicholson, E. Holmes (Eds.), *The handbook of metabonomics and metabolomics*, Elsevier B. V., New York, p. 113-147, 2007.
- CHENG, H.; WEI, K.; WANG, L. **The Impact of Variety, Environment and Agricultural Practices on Catechins and Caffeine in Plucked Tea Leaves**. Processing and Impact on active on active components in food, p. 597-603, 2015.
- CHENG, S.; FU, X.; WANG, X.; LIAO, Y.; ZENG, L., DONG, F.; YANG, Z. Studies on the biochemical formation pathway of the amino acid L-theanine in tea (*Camellia sinensis*) and other plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 7210-7216, 2017.
- CHEN, L.; APOSTOLIDES, Z.; CHEN, ZONG-MAO. **Global tea breeding: achievements, challenges and perspectives. Advances topics in Science and technology in China**. Springer: 2012.
- CHOZE, R.; ALCANTARA, G. B.; FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; FARIA, J. C.; LIÃO, L. M. Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by ¹H HR-MAS NMR. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2841–2847, 2012.
- CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**, Elsevier, Amsterdam, p. 335-371, 2009.
- DAGLIA, M.; ANTIOCHIA, R.; SOBOLEV, A. P.; MANNINA, L. Untargeted and targeted methodologies in the study of tea (*Camellia sinensis* L.). **Food Research International**, v. 63, p. 275-289, 2014.
- DAI, W.; XIE, D.; LU, M.; LI, P.; LV, H.; YANG, C.; PENG, Q.; ZHU, Y.; GUO, L.; ZHANG, Y.; TAN, J.; LIN, Z. Characterization of white tea metabolome: comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach. **Food Research International**, v. 96, p.40-45, 2017.

- DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry Review**. v.7, 281-299, 2008.
- DEB, S.; POU, K. R. J. A review of withering in the processing of black tea. **Journal of Biosystems Engineering**. v. 41, p. 365-372, 2016.
- DEBORDE, C.; MOING, A.; ROCH, L. JACOB, D.; ROLIN, D. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 102-103, p. 61-97, 2017.
- DELGADO-GOÑI. T.; CAMPO S.; SITIAR, J. M.; CABAÑAS, M. E.; SEGUNDO, B. S.; ARUS, C. Assessment of a ¹H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy procedure for free sugars quantification in intact plant tissue. **PLANTA**, v. 238, p. 397-413, 2013.
- DENG, WEI-WEI.; OGITA, S.; ASHIHARA. Distribution and biosynthesis of theanine in Theaceae plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 70-72, 2010.
- DEWICK. P. **Medicinal Natural Products**. 3^a edição, São Paulo: Wiley, 2009.
- DI FERDINANDO, M.; BRUNETTI, C.; FINI, A.; TATTINI, M. **Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses**. In: Ahmad P., Prasad M. (eds) *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer, New York, NY, 2012.
- DONG, C.; LIANG, G.; HU, G.; YUAN, H.; JIANG, Y.; ZHU, H.; OI, J. Prediction of congou black tea fermentation quality indices from color features using non-linear regression methods. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-11, 2018a.
- DONG, J. W.; LI, X.J.; SHI, J.Y.; LI, Y.F.; YANG, C.; LI, Z.J. Simultaneous determination of alkaloids dicentrine and sinomenine in *Stephania epigeae* by ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 160, p.330-335, 2018b.
- DREW, L. Making tea. *Nature*, v. 566, S2-S4, 2019.

- DUARTE, C. J.; CONALGO, L. A.; AZEREDO, R. B. V.; VENÂNCIO, T. Solvent suppression in high-resolution ^1H NMR spectroscopy, using conventional and phase alternated continuous wave free precession. **Application Magnetic Resonance**, v. 44, p. 12650-1280, 2013.
- DUYNHOVEN, J.; VELZEN, E.; JACOBS, D. M. **Quantification of complex mixtures by NMR**, in: G.A. Webb (Ed.), Annual Reports on NMR Spectroscopy, v. 80, Academic Press, Elsevier, Oxford, p. 181–236, 2013.
- ENGELHARDT, U. H. Chemistry of Tea. **Comprehensive Natural Products II**, p. 999, 2013.
- EISENSTEIN, M. Tea for tumours. *Nature*, v. 566, S6-S7, 2019.
- FANG, J.; SUREDA, A.; SILVA, A. S.; KHAN, F.; XU, S.; NABAVI, S. M. Trends of tea in cardiovascular health and disease: A critical review, **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 385-396, 2019.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World tea production and trade current and future development**, p.1-17, 2015.
- FAO. **Current Market situation and medium term outlook for tea to 2027**, Twenty-third Session of the Intergovernmental Group on Tea. May, 2018.
- FAROOQ, H.; COURTIER-MURIAS, D.; SOONG, R.; BERMEL, W.; KINGERY, W. M.; SIMPSON, A. J. HR-MAS NMR spectroscopy: a practical guide for natural samples. **Current Organic Chemistry**, v. 17, p. 3013-3031, 2013.
- FARRANT, R. D.; HOLLERTON, J. C.; LYNN, S. M.; PROVERA, S.; SIDEBOTTOM, P. J.; UPTON, R. J. NMR quantification using an artificial signal. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, p. 753-762, 2010.

- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Editora: Unicamp, 2015.
- FLORES, I. S.; MARTINELLI, B. C. B.; PINTO, V. S.; QUEIROZ-JUNIOR, L. H. K.; LIÃO, L. M. Important issues in plant tissues analyses by HR-MAS NMR. **Phytochemical Analysis**, v.30, n.1, p. 5-13, 2019.
- FLORES, I. S.; SILVA, A. I.; FURQUIM, L. C.; CASTRO, C. F. S.; CHAVES, L. J.; COLLEVATTI, R. G.; LIÃO, L. M. HR-MAS NMR allied to chemometric on *Hancornia speciosa* varieties. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 708-714, 2018.
- FRIEDMAN, M.; MACKEY, B.E.; KIM, H. J.; LEE, I. S.; LEE, K. R.; LEE, S. U.; KOZUKUE, E.; KOZUKUE, N. Structure-activity relationships of tea compounds against human cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 243-253, 2009.
- FUMAGALLI, E.; BALDONI, E.; ABBRUSCATO, P.; PIFFANELLI, A.; GENGA, A.; LAMANNA, R.; CONSINNI, R. NMR Techniques Coupled with Multivariate Statistical Analysis: Tools to Analyse *Oryza sativa* Metabolic Content under Stress Conditions. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.195, p.77-88, 2009.
- GASPAR, S.; RAMOS, F. Caffeine: consumption and health effects. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 573-578, 2016.
- GILBERT, N. The science of tea's mood-altering magic. **Nature**, v. 566, S8-S9, 2019.
- GIRAUDEAU, P. Quantitative 2D liquid-state NMR, **Magnetic Resonance Chemistry**, v.52, p. 259–272, 2014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

- GÖDECKE, T.; YAO, P.; NAPOLITANO, J.G.; NIKOLIC, D.; DIETZ, B.M.; BOLTON, J.L.; VAN BREEMEN, R.B.; FARNSWORTH, N.R.; CHEN, S.N.; LANKIN, D.C.; PAULI, G.F. Integrated standardization concept for *Angelica* botanicals using quantitative NMR. **Fitoterapia**, v. 83, p. 18-32, 2012.
- GOTTLIEB, O. R. Evolution of flavonoids in Embryobionta. In: **Micromolecular evolution, systematics and ecology**: an essay into a novel botanical discipline, Springer, 1982.
- GRAAF, R. A.; BEHAR, K. L. Quantitative ^1H NMR spectroscopy of blood plasma metabolites, **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2100-2104, 2003.
- HAYS, P. A. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit forensic drug seizures. **Journal of Forensic Sciences**, v. 50, p. 1-19, 2005.
- HOLLIS, D. P. Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 35, 1682–1684, 1963.
- HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, p. 229–240, 2010.
- HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.; WAWER, I. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**, Elsevier, 2008.
- HONG, R. S.; HWANG, K. H.; KIM, S.; CHO, H. E.; LEE, H. J.; HONG, J. T.; MOON, D. C. Survey of ERETIC2 NMR for quantification. **Journal of the Korean Magnetic Resonance Society**, v. 17, p. 98-104, 2013.
- HOU, C. W.; JENG, K. C.; CHEN, Y. S. Enhancement of fermentation process in Pu-Erh tea by tea- leaf extract. **Journal of Food Science**, v. 75, p. H44-H48, 2010.
- IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>

JÉGOU, C.; CULIOLI, G.; KERVAREC, N.; SIMON, G.; STIGER-POUVREAU, V.; LC/ESIMSn and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). **Talanta**, v. 83, p. 613-622, 2010.

JI, HYANG-GI.; LEE, YEONG-RAN.; LEE, MIN-SEUK.; HWAN, K. H.; KIM, EUN-HEE.; PARK, JUN-SEONG. Metabolic phenotyping of various tea (*Camellia sinensis* L.) cultivars and understanding of their intrinsic metabolism. **Food Chemistry**, v. 233, p. 321-330, 2017.

JOLVIS POU, K. R. Fermentation: The key step in the processing of black tea. **Journal of Biosystems Engineering**. v.41, p. 85-92, 2016.

JUNGNICKEL, J. L.; FORBES, J. W. Quantitative measurement of hydrogen types by integrated Nuclear Magnetic Resonance intensities. **Analytical**

KEIFER, P. A.; BALTUSIS, L.; RICE, D. M.; TYMLAK, A. A.; SHOOLERY, J. N. A comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high resolution, magic-angle-spinning, and high-resolution magic-angle spinning probes. **Journal of Magnetic Resonance A**, v. 66, p. 65-75t, 1996.

KELLOGG, J. J.; GRAF, T. N.; PAINE, M. F.; McCUNE, J. S.; KVALHEIM, O. V.; OBERLIES, N.; CECH, N. B. Comparison of metabolomics approaches for evaluating the variability of complex botanical preparations: green tea (*Camellia sinensis*) as a case study. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1457-1466, 2017.

KHALATBARY, A. R.; KHADEMI, E. The green tea polyphenolic catechin, epigallocatechin gallate, and neuroprotection. **Nutritional Neuroscience**, v. 25, p. 1-14, 2018.

KIM, H. K.; KHAN, S. S.; WILSON, E. G.; KRICUN, S. D, P.; MEISSNER, A.; GORALER, S.; DEELDER, A. M.; CHOI, Y. Y.; VERPOORTE, R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. **Phytochemistry**, v. 71, p. 773-784, 2010.

- KIMURA, K.; OZEKI, M. JUNEIA, L. R.; OHIRA, H. L-theanine reduces psychological and physiological stress responses. **Biological Psychology**, v. 74, p. 39-45, 2007.
- KOSTIDIS, S.; ADDIE, R. D.; MORREAU, H.; MAYBORODA, O. A.; GIERA, M. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 980, p. 1-24, 2017.
- KU, K. M.; CHOI, J. N.; KIM, J.; KIM, J. K.; YOO, L. G.; LEE, S. J.; HONG, Y.S.; LEE, C. H. Metabolomics analysis reveals the compositional differences of shade grown tea (*Camellia sinensis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 58, p. 418–426, 2010.
- LAGHA, A. B.; HAAS, B.; GRENIER, D. Tea polyphenols inhibit the growth and virulence properties of *Fusobacterium nucleatum*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.
- LE GALL, G; COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M. Metabolite profiling using ¹H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 692-700, 2004.
- LEE, E-J.; SHAYKHUTDINOV, R.; WELLIE, A.; VOGEL, H. J.; FACCHINI, P. J. Quality assessment of ginseng by ¹H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7513-7522, 2009.
- LEE, J. E.; LEE, B. J.; CHUNG, J. O.; HWANG, J. A.; LEE, S. J.; LEE, C. H.; HONG, Y. S. Geographical and climatic dependencies of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites: a ¹H NMR-based metabolomics study, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10582–10589, 2010.
- LEE, J., LEE, B., HWANG, J.; KO, K.; CHUNG, J.; KIM, E.; LEE, S.; HONG, Y.. Metabolic dependence of green tea on plucking positions revisited: a

- metabolomic study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10579-10585, 2011.
- LEE, J.; LEE, B.; CHUNG, J.; KIM, H.; KIM, E.; JUNG, S.; LEE, H.; LEE, S.; HONG, Y. Metabolomic unveiling of a diverse range of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites dependent on geography. **Food Chemistry**, v. 174, p. 452-459, 2015.
- LEE, J.; LEE, B.; CHUNG, J.; SHIN, H.; LEE, S.; LEE, C.; HONG, Y. 1H NMR-based metabolomic characterization during green tea (*Camellia sinensis*) fermentation. **Food Research International**, v. 44, p. 597-604, 2011.
- LIANG, G.; DONG, C.; HU, B.; ZHU, H.; YUAN, H.; JIANG, Y.; HAO, G. Prediction of moisture content for Congou black tea withering leaves using image features and non-linear method. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-8, 2018.
- LIU, M.; BURGOS, A.; MA, L.; ZHANG, Q.; TANG, D.; RUAN, J. Lipidomics analysis unravels the effect of nitrogen fertilization on lipid metabolism in tea plant (*Camellia sinensis* L.). **BMC Plant Biology**, v. 17, p. 1-10, 2017.
- LUNA, L.; OCHOTERENA, H. Phylogenetic relationships of the genera of Theaceae based on morphology. **Cladistics**, v. 20, p.223-270, 2004.
- MALZ, F.; JANCKE, H.; Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 813-823, 2005.
- MARTINÉZ-BISBAL, M. C.; MONLEON, D.; ASSEMAT, M. P.; PIGUERE, J.; LLACERE, J. L.; CELDA, B. Determination of metabolite concentrations in human brain tumor biopsy samples using HR-MAS and ERETIC measurements. **NMR Biomedicine**, v 22, p.199-206, 2006.
- MARTINS, A.; SCHIMIDT, H. L.; GARCIA, A.; ALTERMANN, C. C. D.; SANTOS, F. W.; SANTOS, F. W.; CARPES, F. P.; SILVA, W. C.; CARPES, P. B. Supplementation with different teas from *Camellia*

sinensis prevents memory deficits and hippocampus oxidative stress in ischemia-reperfusion. **Neurochemistry International**, v. 108, p. 287-295, 2017.

MIN, K-J.; WON, T. K. Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate. **Integrative Medicine Research**, v. 3, p. 16-24, 2014.

MIYATA, Y.; SHIDA, Y.; HAYARIYA, T.; SAKAI, H. Anti-cancer effects of green tea polyphenols against prostate cancer. **Molecules**, v. 24, p. 1-13, 2019.

MONAKHOVA, Y. B.; KOHL-HIMMELSEHER, M. KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D. W.; Determination of the purity of pharmaceutical reference materials by ¹H NMR using the standardless PULCON methodology. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analytical**, v. 100, p. 381-386, 2014.

MU, W.; ZHANG, T.; JIANG, B. An overview of biological production of L-theanine. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 355-342, 2015.

MUCCI, A.; PARENTI, F.; RIGHI, V.; SCHENETTI, L. Citron and lemon under the lens of HR-MAS NMR spectroscopy. **Food chemistry**. v. 141, p. 3167-3176, 2013.

MUKHOPADHYAY, M.; MONDAL, T. K.; CHAND, P. Changes biotechnological advances in tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze): a review. **Plant Cell Reports**, v. 35, p. 255-287, 2015.

NAPOLITANO, J. G.; GÖDECKE, T.; LANKIN, D. C.; JAKI, B. U.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Orthogonal analytical methods for botanical standardization: determination of green tea catechins by qNMR and LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 93, p. 59-67, 2014.

NAPOLITANO, J. G.; GÖDECKE, T.; RODRÍGUES-BRASCO, M. F.; JAKI, B. U.; CHEN, S. N.; LANKIN, D. C.; PAULI, G. F. The tandem of full spin

analysis and qNMR for the quality control of botanicals exemplified with *Ginkgo biloba*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 238-248, 2012.

NAVRATILOVA, K.; HRBEK, V.; KRATKY, F.; HURKOVA, K.; TOMANIOVA, M.; PULKRABOVA, J.; HAJSLLOVA, J. Green tea: authentication of geographic origin based on UHPLC-HRMS fingerprints. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, p. 121-128, 2019.

NINOMIYA, M.; KOKETSU, M. **Minor Flavonoids** (Chalcones, Flavanones, Dihydrochalcones, and Aurones). Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.

NOMIZU, K.; HASHIDA, K.; MAKINO, R.; OHARA, S. Antioxidants from steamed used tea leaves and their reaction behaviour. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 72, p. 1682-1689, 2008.

OESTREICH-JANZEN, S. Caffeine: characteristics and properties. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 556-572, 2016.

OHTSUKI, T., SATO, Y., ABE, SUGIMOTO, N, AKIYAMA, H. Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative ¹H NMR. **Talanta**, v. 131, p. 712-718, 2015.

OLIVEIRA, J.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flavonols: Catechins and Proanthocyanidins. In: RAMAWAT, K.; MÉRILLON, J. M. **Natural Products**, Springer, p. 1753-1801, 2013.

PAULI, G. F.; CHEN, SHAO-NONG; SIMMLER, C.; LANKIN, D. C., GÖDECKE, T.; JAKI, B. U.; FRIESEN, J. B.; MCALPINE, J. B.; NAPOLITANO, J. G. Importance of purity evaluation and the potential of quantitative ¹H NMR as a purity assay miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 9220-9231, 2014.

PAULI, G. F.; GODECKE, T.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ¹H NMR. Development and potential of an analytical method: An update. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 834-851, 2012.

- PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for products analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 133-149, 2005.
- RENAULT, M.; SHINTU, L.; PIOTTO, M.; CALDARELLI, S. Slow-spinning low-sideband HR-MAS NMR spectroscopy: delicate analysis of biological samples. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013.
- SAEED, M.; NAVEED, M.; ARIF, M.; KAKAR, M. A.; MANZOOR, R.; EL-HACK, M. E. A.; ALAGAMY, M.; TIWARI, R.; KHANDIA, R., MUNJAL, A.; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; IQBAL, H. M.N.; DADAR, M.; SUN, C. Green tea (*Camellia sinensis*) and L-theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans-A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacology**, v. 95, p. 1260-1275, 2017.
- SAITO, S. T.; GOSMANN, G.; SAFFI, J.; PRESSER, M.; RICHTER, M. F.; BERGOLD, A. M. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 Cultivar) Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9409–9414, 2007.
- SALAZAR, P. L.; PISANO, P. L.; SIERRA, M. G.; FURLAN, R. L. E. NMR and multivariate data analysis to assess traceability of argentine *citrus*. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 264–270, 2018.
- SANTOS, A. D. C.; FONSECA, F. A.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B.; BARISON, A. High resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance in foodstuff analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 10-18, 2015.
- SANTOS, M. S.; PEREIRA-FILHO, E.R.; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; FIGUEIRA, G. M. Authenticity study of *Phyllanthus* species by NMR and FT-IR techniques coupled with chemometrics methods. **Química Nova**, v. 35, p. 2210-2217, 2012.
- SAVORANI, F.; RASMUSSEN, M. A.; MIKKELSEN, M. S.; ENGELSEN, S. B. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and

chemometrics. **Food Research International**, v. 54, p. 1131–1145, 2013.

SEBIH, F.; ROUSSET, M.; BELLAHOUEL, S.; ROLLAND, M.; FERREIRA, M. C.; GUIRAMAND, J.; COHEN-SOLAL, C.; BARBANEL, G.; CENS, T.; ABOUAZZA, M.; TASSOU, A.; GRATUZE, M.; MEUSNIER, C.; CHARNET, P.; VIGNES, M.; ROLLAND, V. Characterization of L-Theanine Excitatory Actions on Hippocampal Neurons: Toward the Generation of Novel N-Methyl-D-aspartate Receptor Modulators Based on Its Backbone. **Chemical Neuroscience**, v. 8, p. 1724-1734, 2017.

SHARMA, V.; RAMAWAT, K.G. **Isoflavonoids**. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.

SIGMA ALDRICH. QUANTITATIVE NMR Technical Details and TraceCERT® Certified Reference Materials. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/qnmr-brochure-rjo.pdf> acesso em 20/06/2019.

SILVA, L.; GODEJOHANN, M.; MARTIN, F. P. J.; COLLINO, S.; BÜRKLE, A.; VILLANUEVA, M.; BERNHARDT, J.; TOUSSAINT, O.; GRUBECK-LOEBEBSTEIN, B.; GONOS, E. S.; SIKORA, E.; GRUNE, T.; BREUSING, N.; FRANCESCHI, C.; HERVONEN, A.; SPRAUL, M.; MOCO, S. High-resolution quantitative metabolome analysis of urine by automated flow injection NMR. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 5801–5809, 2013.

SILVA, L. M. A.; FILHO, E. G. A.; CHOZE, R.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B. ¹H HR-MAS NMR spectroscopy and chemometrics for evaluation of metabolic changes in *Citrus sinensis* caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, p. 1054-1061, 2012.

SIMMLER, C.; GRAHAMA, J. G.; SHAO-NONG, C.; PAULI, G. F. Integrated analytical assets aid botanical authenticity and adulteration management. **Fitoterapia**, v. 129, p. 401-414, 2018.

- SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J. G.; McALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Universal quantitative analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, v.25, p. 51-59, 2014.
- SMOLINSKA, A.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M.C.; WIJMENGA, S. S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 82– 97, 2012.
- SOUSA, S. A. A.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, M. M. C. Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 122, p. 93-102, 2013.
- TARACHIWIN, L.; UTE, K.; KOBAYASHI, A.; FUKU, E. ¹H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 55, p. 9330-9336, 2007.
- TSUBAKI, S.; SAKUMOTO, S.; UEMURA, N.; AZUMA, J. Compositional analysis of leaf cuticular membranes isolated from tea plants. **Food Chemistry**, v. 138, p. 286-290, 2013.
- TURLAND, N. J., WIERSEMA, J. H., BARRIE, F. R., GREUTER, W., HAWKSWORTH, D. L., HERENDEEN, P. S., KNAPP, S., KUSBER, W.-H., LI, D.-Z., MARHOLD, K., MAY, T. W., MCNEILL, J., MONRO, A. M., PRADO, J., PRICE, M. J. & SMITH, G. F. (eds.): International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, Regnum Vegetabile 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books, 2018 DOI <https://doi.org/10.12705/Code>. 2018.
- UJIHARA, T.; OHTA, R.; HAYASHI, N.; KOHATA, K.; TANAKA, J. I. Identification of Japanese and Chinese green tea cultivars by using simple sequence repeat markers to encourage proper labeling. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 73, p. 15-20, 2009.

- USMAN, A.; THOSS, V.; NUR-E-ALAM, M. Isolation of (-)-epicatechin from *Trichilia emetica* whole seeds. **American Journal of Organic Chemistry**, v. 6, p. 81-85, 2016.
- VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC GENOMICS**, v. 142, p. 1-15, 2006.
- VUONG, Q. V.; BOWYER, M. C.; ROACH, P. D. L-Theanine properties, synthesis and isolation from tea. **Journal Scientific Food Agricultural**, v. 91, p. 1931–1939, 2011.
- WANG, H.; PENG, C.; CHEN, Y. Phenolics from *Elaeocarpus braceanus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, p.1167-1168, 2015.
- WANG, W.; YANG, Y.; ZHANG, W.; WU, W. Association of tea consumption and the risk of oral cancer: A meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 50, p. 276-281, 2014.
- WANG, Y, ZHENG, P.; LIU, P.; SONG, X.; GUO, F.; LI, Y.; NI, D.; JIANG, C. Novel insight into the role of withering process in characteristic flavor formation of teas using transcript analysis and metabolite profiling, v. 272, p. 313-322, 2019.
- WEI, C.; YANG, H.; WANG, S.; ZHAO, J.; LIUB, C.; GAO, L.; XIA, E.; LUC, Y.; TAI, Y.; SHEA, G.; SUN, J.; CAO, H.; TONG, W.; GAO, Q.; LIA, Y.; DENG, W.; JIANG, X.; WANG, W.; CHEN, Q.; SHIHU, Z.; LIA, H.; WU, J.; WANG, P.; LI, P.; SHI, C.; ZHENG, F.; JIAN, J.; HUANG, B.; SHAN, D.; SHI, M.; FANG, C.; YUE, Y., LI, F.; LI, D.; WEI, S.; HAND, B.; JIANG, C.; YIN, Y.; XIA, T.; ZHANG, Z.; JEFFREY, B.; L. SHANCEN, Z.; WAN, X. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 115, p. E4151-4158, 2017.

- WEI, F.; FURIHATA, K.; KODA, M.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: time course of changes in composition, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1005–1012, 2012.
- WIDER, G.; DRELER, L. Measuring Protein Concentrations by NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 2571-2576, 2006.
- WEBER, M.; HELLRIEGEL, C.; RUECK, A.; WUETHRICH, J., JENKS, P. Using high-performance ¹H NMR (HP-qNMR®) for the certification of organic reference materials under accreditation guidelines - Describing the overall process with focus on homogeneity and stability assessment, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 93 p.102-110, 2014.
- WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 228-237, 2008.
- WOLFENDER, JEAN-LUC.; MARTIA, G.; THOMAS, A.; BERTRANDA, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p.136–164, 2015.
- YAGI, C.; IKEDA, N.; SATO, D. Characteristics of eight Japanese tea cultivars. College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaií of Mänoa. 2010.
- ZHANG Q., ZHAO X., QIO H. Flavones and flavonols: phytochemistry and biochemistry. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) **Natural Products**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.
- ZHENG, XQ.; JIN, J.; CHEN, H.; DU, Y. Y.; YE, J. H.; LU, J. L.; DONG, J. J.; SUN, Q. L.; WU, J.Y.; WU, L.Y. LIANG, Y. R. Effect of ultraviolet B irradiation on accumulation of catechins in tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 383-3287, 2008.

ZHU, G.; YANG, S.; XIE, Z.; WAN, X. Synaptic modification by L-theanine, a natural constituent in green tea, rescues, the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in AD mice. **Neuropharmacology**, v. 138, p, 331-340, 2018.

ANEXO 1

1. Análise por CG-EM do timol

O timol foi adquirido da Sigma Aldrich (98% de pureza). Uma solução de timol (1 mg mL^{-1}) foi injetada em cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Shimadzu QP-2010 Plus, equipado com uma coluna capilar RTX-5 [5% difenil - 95% dimetil polisiloxano] (Restek, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), operando com ionização por impacto de elétrons (70 eV). A amostra foi injetada em modo *split* (1:50) com a temperatura do injetor a 250 °C. A temperatura inicial do forno da coluna foi de 40 °C, mantida por um minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7 °C min^{-1} até alcançar 250 °C, a qual foi mantida por 10 minutos. A seguir são apresentados o cromatograma e o espectro de massas do timol.

FIGURA 87 – CROMATOGRAMA DO CG/MS DO TIMOL (TEMPO DE RETENÇÃO EM MIN).

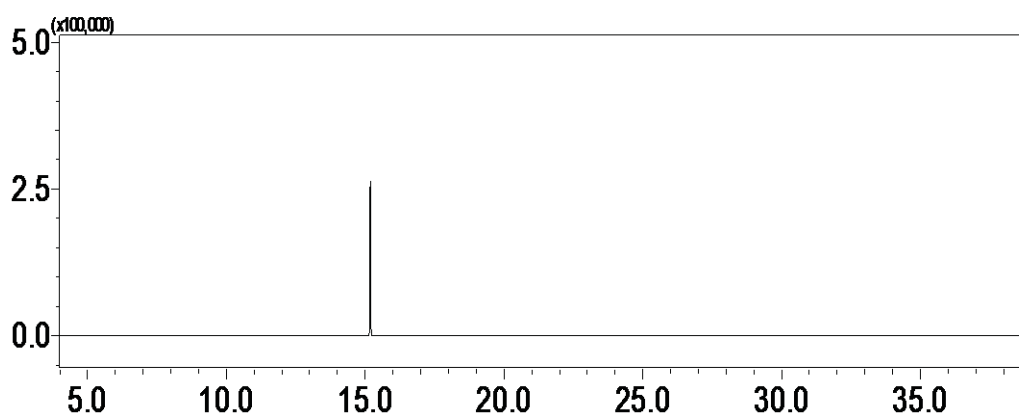
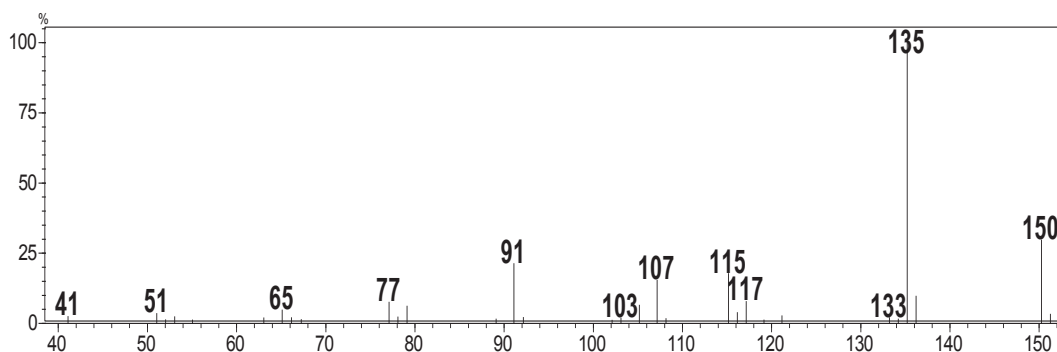


FIGURA 88 - ESPECTRO DE MASSAS DO TIMOL (m/z 150).



ANEXO 2

A análise de RMN HR-MAS de ^1H quantitativo utilizando o método ERETIC foi realizada em triplicata e os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão.

TABELA 1- VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DO TEOR (EM mg g^{-1}) DE α -ÁCIDO LINOLÊNICO NO CHÁ VERDE OBTIDOS POR RMN HR-MAS DE ^1H QUANTITATIVO VIA ERETIC.

Meses da safra do chá verde	Ácido linolênico	
	<i>C. sinensis</i> 'Yabukita'	<i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'
	Média \pm Desvio padrão	Média \pm Desvio padrão
Outubro	0,0332 \pm 0,0021 ^a	0,0355 \pm 0,0262 ^b
Novembro	0,0266 \pm 0,0024 ^{b,c}	0,0367 \pm 0,0365 ^a
Dezembro	0,0240 \pm 0,0022 ^c	0,0272 \pm 0,0431 ^c
Janeiro	0,0284 \pm 0,0009 ^{a, b,c}	0,0313 \pm 0,0025 ^{a,b,c}
Fevereiro	0,0241 \pm 0,0013 ^c	0,0281 \pm 0,0029 ^{b,c}
Março	0,0289 \pm 0,0033 ^{a, b,c}	0,0258 \pm 0,0020 ^c
Abril	0,0311 \pm 0,0001 ^{a,b}	0,0311 \pm 0,0018 ^{a,b,c}

NOTA: Os valores seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 2 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DO TEOR (EM mg g^{-1}) DE TEANINA NO CHÁ VERDE OBTIDOS POR RMN HR-MAS DE ^1H QUANTITATIVO VIA ERETIC.

Meses da safra do chá verde	Teanina	
	<i>C. sinensis</i> 'Yabukita'	<i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'
	Média \pm Desvio padrão	Média \pm Desvio padrão
Outubro	0,0205 \pm 0,0015 ^b	2,83E-04 \pm 0,0015 ^a
Novembro	0,0082 \pm 0,006 ^c	4,07E-03 \pm 0,0006 ^c
Dezembro	0,0014 \pm 0,0001 ^d	2,09E-03 \pm 0,0002 ^{c,d}
Janeiro	0,0016 \pm 0,0000 ^d	1,77E-03 \pm 0,0002 ^d
Fevereiro	0,0014 \pm 0,0001 ^d	1,63E-04 \pm 0,0002 ^c
Março	0,0107 \pm 0,0013 ^c	1,21E-03 \pm 0,0008 ^b
Abril	0,1450 \pm 0,0016 ^a	1,35E-03 \pm 0,0008 ^b

NOTA: Os valores seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 3 – VALORES MÉDIOS E O DESVIO PADRÃO DO TEOR (EM mg g⁻¹) DE EPI-CATEQUINA NO CHÁ VERDE OBTIDOS POR RMN HR-MAS DE ¹H QUANTITATIVO VIA ERETIC.

Meses da safra do chá verde	Epi-catequina	
	<i>C. sinensis</i> 'Yabukita'	<i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
Outubro	0,0019 ± 0,0002 ^a	0,0034 ± 0,0000 ^c
Novembro	0,0022 ± 0,0004 ^a	0,0051 ± 0,0000 ^b
Dezembro	0,0019 ± 0,0002 ^a	0,0033 ± 0,0000 ^c
Janeiro	0,0021 ± 0,0001 ^a	0,0030 ± 0,0000 ^c
Fevereiro	0,0012 ± 0,0001 ^b	0,0033 ± 0,0000 ^c
Março	0,0018 ± 0,0002 ^{a,b}	0,0117 ± 0,0000 ^a
Abril	0,0016 ± 0,000 ^{a,b}	0,0028 ± 0,0000 ^c

NOTA: Os valores seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes com base no teste de Tukey (p < 0,05).

TABELA 4 - VALORES MÉDIOS E O DESVIO PADRÃO DO TEOR (EM mg g⁻¹) DE CAFEÍNA NO CHÁ VERDE OBTIDOS POR RMN HR-MAS DE ¹H QUANTITATIVO VIA ERETIC.

Meses da safra do chá verde	Cafeína	
	<i>C. sinensis</i> 'Yabukita'	<i>C. sinensis</i> 'Yutakamidori'
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
Outubro	0,0034 ± 0,0002 ^b	0,0040 ± 0,0002 ^{b,c}
Novembro	0,0034 ± 0,0002 ^b	0,0054 ± 0,0006 ^b
Dezembro	0,0046 ± 0,0003 ^a	0,0178 ± 0,0021 ^a
Janeiro	0,0035 ± 0,0001 ^b	0,0033 ± 0,0004 ^{b,c}
Fevereiro	0,0026 ± 0,0001 ^{b,c}	0,0037 ± 0,0002 ^{b,c}
Março	0,0022 ± 0,0008 ^c	0,0025 ± 0,0001 ^c
Abril	0,0025 ± 0,0000 ^{b,c}	0,0026 ± 0,0001 ^c

NOTA: Os valores seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes com base no teste de Tukey (p < 0,05).