

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAPHAELA PEREIRA GUARINGUE

PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE *Camellia sinensis* (L.) KUNTZE

PONTA GROSSA
2022

RAPHAELA PEREIRA GUARINGUE

PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE *Camellia sinensis* (L.) KUNTZE

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Barbara Celânia Fiorin
Coorientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Cássia Gonçalves
Magalhães

PONTA GROSSA
2022

G915 Guaringue, Raphaela Pereira
Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante de extratos de
Camellia sinensis (L.) Kuntze / Raphaela Pereira Guaringue. Ponta Grossa, 2023.
66 f.

Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Barbara Celânia Fiorin.
Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Gonçalves Magalhães.

1. Chá verde. 2. *Camellia sinensis*. 3. Atividade antioxidante. 4.
Espectrometria de massas. I. Fiorin, Barbara Celânia. II. Magalhães, Cássia
Gonçalves. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 574.192



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <http://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

RAPHAELA PEREIRA GUARINGUE

“PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Camellia sinensis* (L.) KUNTZE”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora: Profa. Dra. Barbara Celânia Fiorin

UEPG/PR

Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte

UFMG/MG

Profa. Dra. Romaisa Picada Pereira

UEPG/PR

Ponta Grossa, 04 de outubro de 2022



Documento assinado eletronicamente por Barbara Celania Fiorin, Professor(a), em 06/10/2022, às 10:48, conforme Resolução UEPG-CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.

Documento assinado eletronicamente por Romaisa Picada Pereira, Professor(a), em 06/10/2022, às 15:02, conforme Resolução UEPG-CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Lucienir Pains Duarte, Usuário Externo**, em 07/10/2022, às 17:25, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 1163917 e o código CRC 6FAE530A.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por todo o suporte e incentivo, por me apoiarem nos momentos difíceis e vibrarem com cada conquista, sem vocês não teria chegado aqui.

Agradeço ao meu namorado pela paciência e apoio durante este período, tê-lo ao meu lado foi essencial durante esta fase.

Agradeço as minhas orientadoras Barbara e Cássia, por todo o ensinamento compartilhado, toda paciência e por acreditar sempre em mim, fazendo o amor que sinto pela pesquisa crescer a cada dia.

Aos meus amigos, Alessandra e Maycon que sempre estiveram ao meu lado para compartilhar as experiências, não poderia ter pessoas melhores ao meu lado.

Agradeço aos colegas de laboratório, por toda a ajuda e experiências compartilhadas nestes anos.

Agradeço a CAPES pelo fomento e a UEPG pela oportunidade de realizar este trabalho.

Enfim, agradeço a todos que participaram dessa trajetória, sempre tive a ajuda de muitas pessoas, que levo com carinho para a minha vida. Muito obrigada.

Dedico este trabalho à todas
as vítimas de COVID-19.

RESUMO

O chá verde, produzido a partir das folhas de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, é conhecido pelo seu alto teor de flavonoides, principalmente as catequinas, que estão associadas a seu poder antioxidante. Neste trabalho, foi realizada a infusão em água do chá verde obtido no comércio local, tanto na forma de sachê quanto em granel. O extrato aquoso foi tratado com acetato de etila para separação da maior parte dos compostos fenólicos presentes nos chás. A caracterização das amostras foi feita a partir das metodologias de teor de fenólicos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o teor de flavonoides pelo método colorimétrico de cloreto férrico. As caracterizações foram feitas por espectrometria de massas e espectroscopia de RMN de ^1H . Com isto foram realizados testes de atividade antioxidante pelas metodologias de captura do radical DPPH, ABTS e por redução do íon ferro e teste de viabilidade celular utilizando células de fibroblastos linhagem 3T3, pelo método do MTT em 24 e 48 horas. Também foram realizados cálculos teóricos para a análise conformacional da (+)-catequina, importante componente do chá verde. Com a realização das análises descritas foi possível observar o mesmo teor de fenólicos em ambos os extratos, porém, o teor de flavonoides do extrato de chá verde em sachê foi maior que o a granel, na caracterização por espectrometria de massas isto foi confirmado, sendo possível identificar todas as catequinas no extrato de chá verde em sachê, e no extrato a granel foi obtido um maior número de ácidos fenólicos. A partir da análise do espectro de RMN de ^1H do extrato de chá em sachê, foram encontrados sinais característicos de todos os compostos detectados na espectrometria de massas, confirmando a presença destes componentes no chá. A atividade antioxidante a partir das três metodologias testadas foi maior para o extrato de chá verde em sachê, podendo desta forma relacionar o maior número de flavonoides deste extrato com o melhor potencial antioxidante. A viabilidade celular foi testada para o extrato de chá verde em sachê, e observou-se uma diminuição da viabilidade em concentrações acima de 1mg/mL, em 24 e 48 horas, nas outras concentrações testadas as células permaneceram viáveis.

Palavras-chave: Chá verde, *Camellia sinensis*, RMN de ^1H , viabilidade celular, atividade antioxidante, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Green tea, produced from the leaves of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, is known for its high content of flavonoids, mainly catechins, which are associated with its antioxidant activity. In this work, the infusion of green tea, obtained in the local market, was carried out in water, both in the form of sachets and in bulk. The aqueous extract was treated with ethyl acetate to separate most of the phenolic compounds present in the teas. The characterization of the samples was carried out using the phenolic content methodologies from the Folin-Ciocalteu reagent and the flavonoid content using the ferric chloride colorimetric method. Spectroscopic characterizations were performed by mass and ^1H NMR. With that, tests of antioxidant activity were carried out by the radical capture methodologies DPPH, ABTS and by reduction of the iron ion and cell viability test using fibroblast cells lineage 3T3, by the MTT method in 24 and 48 hours. Theoretical calculations were also performed for the conformational analysis of (+)-catechin, an important component of green tea. With the performance of the analyzes described, it was possible to observe the same phenolic content in both extracts, however, the flavonoid content of the green tea extract in sachet was higher than the bulk, in the characterization by mass spectrometry this was confirmed, being possible to identify all the catechins in the green tea extract in sachet, and in the bulk extract a greater number of phenolic acids was obtained. From the ^1H NMR of tea extract in sachet, it was found signals of all compounds detected by mass spectrometry, confirming the presence of these components in tea. The antioxidant activity for the three methodologies tested was better for the green tea extract in sachet, being able to relate the greater number of flavonoids in this extract with the best antioxidant potential. Cell viability was tested for the green tea extract in sachet, and it was observed a decrease in viability at concentrations above 1mg/mL, at 24 and 48 hours, for the other tested concentrations the cells remained viable.

Keywords: Green tea, *Camellia sinensis*, ^1H NMR, cell viability, antioxidant activity, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do α -humuleno e (-)-trans-cariofileno	17
Figura 2- Estrutura química dos alcaloides a) cafeína b) morfina c) cocaína d) nicotina.....	18
Figura 3- Estrutura geral de a) ácidos hidroxibenzoicos e b) hidroxicinâmicos. R=OH.....	19
Figura 4- Esqueleto básico das Classes de flavonoides.....	20
Figura 5- Representação esquemática da biossíntese de flavonoides.	20
Figura 6- Foto da espécie <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....	21
Figura 7- Composição química do chá verde.	22
Figura 8- Derivados de catequina.	23
Figura 9- Diferenças estruturais na classe de catequinas.	26
Figura 10- Equação da Reação de Folin-Ciocalteu com ácido gálico.	34
Figura 11- Curva do padrão de ácido gálico.	35
Figura 12- Reação da (+)-catequina com cloreto de alumínio.	36
Figura 13- Curva do padrão de catequina.....	36
Figura 14- Equação da Reação geral entre o radical DPPH• e uma substância antioxidante (A-H).....	37
Figura 15- Gráfico da porcentagem de inibição versus a concentração das amostras de chá verde (granel e sachê).	38
Figura 16- Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	39
Figura 17- Gráfico da porcentagem de inibição versus a concentração das amostras de chá verde (granel e sachê) e do padrão ácido ascórbico.....	39
Figura 18- Curva de calibração ácido ascórbico para avaliar o poder redutor do Fe (III).....	40
Figura 19- Efeito do extrato de chá verde em sachê sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 horas, pelo método do MTT. As concentrações testadas estão em mg/mL, e a análise estatística utilizada foi o teste post-hoc de Tukey. ***P<0,001 comparado ao grupo controle.....	42
Figura 20- Efeito do extrato de chá verde em sachê sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 48 horas, pelo método do MTT. As concentrações testadas estão em	

mg/mL, e a análise estatística utilizada foi o teste post-hoc de Tukey. ***P<0,001 comparado ao grupo controle.....	42
Figura 21- Compostos presentes no extrato de chá verde a granel	44
Figura 22- Espectro de massas da amostra de chá verde a granel.....	45
Figura 23- Espectro de massas da amostra de chá verde em sachê.....	45
Figura 24- Espectro de RMN de ¹ H total do extrato de sachê de chá verde em CD ₃ OD.....	47
Figura 25- Estruturas de compostos identificados no espectro de RMN de ¹ H do extrato de chá verde (sachê).	48
Figura 26- Espectro de RMN de ¹ H em metanol-d ₄ do extrato de chá verde em sachê com expansão de 2,45 até 3,00 ppm	49
Figura 27- Espectro de RMN de ¹ H em metanol-d ₄ do extrato de chá verde em sachê com expansão de 3,20 até 4,07 ppm.	49
Figura 28- Espectro de RMN de ¹ H em metanol-d ₄ do extrato de chá verde em sachê com expansão de 4,15 até 6,00 ppm.	50
Figura 29- Espectro de RMN de ¹ H em metanol-d do extrato de chá verde em sachê com expansão de 6,05 até 7,00 ppm.	50
Figura 30- Espectro de RMN de ¹ H em metanol-d ₄ do extrato de chá verde em sachê com expansão de 7,05 até 8,07 ppm.	51
Figura 31- Estrutura da (+)-catequina com ênfase nos ângulos diedros α e β	54
Figura 32- Gráfico de scan obtido com o giro do ângulo diedro α da (+)-catequina. .	54
Figura 33- Conformações mais estáveis da (+)-catequina e suas populações.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Teor de fenólicos e erro experimental	35
Tabela 2- Teor de flavonoides das amostras de chá a granel e sachê com erro experimental calculado	37
Tabela 3- Compostos encontrados nas amostras de chá verde a granel e em sachê, seus íons negativos, fragmentos observados e energia de colisão utilizada.	43
Tabela 4- Sinais obtidos teoricamente e experimentalmente para o espectro de RMN de ¹ H em metanol-d ₄ de extrato de chá verde em sachê.	46
Tabela 5- Energias relativas em kcal/mol e ângulos diedros dos confôrmeros da (+)-catequina.....	56
Tabela 6- Principais interações hiperconjugativas da (+)-catequina e suas energias de estabilização em kcal/mol.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS** –2,2-Azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-acidosulfônico)
- AC**- Ácido clorogênico
- AG**- Ácido gálico
- CAF**- Cafeína
- CAT**- Catequina
- DNA**- Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”
- DPPH**- 1,1-Difenil-2-picrilidrazila
- ECG**- Epicatequina galato
- EGC**- Epigallocatequina
- EGCG**- Epigallocatequina galato
- EC**- Epicatequina
- HPLC**- Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “*High performance liquid chromatography*”
- IC₅₀**- Concentração inibitória média
- MS**- Espectrometria de massas
- MTT**- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- LDL**- Lipoproteína de baixa densidade, do inglês “*Low density lipoprotein*”
- NBO**- Orbitais naturais de ligação, do inglês “*Natural bond orbital*”
- PAF**- Fator de ativação plaquetária, do inglês “*Platelet activating fator*”
- pH**- Potencial hidrogeniônico
- ROS**- Espécies reativas de oxigênio, do inglês “*Reactive oxygen species*”
- UMB**- Umbeliferona
- DFT**- Teoria do funcional da densidade, do inglês “*Density-functional theory*”

SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	16
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	18
2.2.1 Ácidos Fenólicos	18
2.2.2 Flavonoides	19
2.3 CHÁ VERDE.....	21
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	24
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 REAGENTES QUÍMICOS.....	29
4.2 MATERIAL VEGETAL	29
4.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO CHÁ VERDE	29
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	30
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	30
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	31
4.6.1 Atividade Frente ao Radical DPPH	31
4.6.2 Atividade Frente ao Radical ABTS	31
4.6.3 Avaliação do Poder Redutor de Ferro	31
4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT	32
4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	32
4.8.1 Análise por Espectrometria de Massas	32
4.8.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear	33
4.9 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	34
5.2 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	35
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH	37

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL ABTS	39
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (III)..	40
5.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR REDUÇÃO DO MTT	41
5.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CHÁ VERDE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	43
5.8 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	46
5.9 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS	53
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 JUSTIFICATIVA

O chá é a segunda bebida não alcoólica mais consumida no mundo, sendo a água a primeira. É usado há cerca de 3 mil anos, principalmente na China. O seu consumo está associado a benefícios relacionados a saúde, bem como a busca por uma melhor qualidade de vida, vinculada ao uso de produtos naturais para o tratamento de doenças, ao invés de medicamentos de origem sintética. Dessa forma, plantas utilizadas sob a forma de chá apresentam grande importância econômica e tem atraído a atenção de pesquisadores no sentido da validação de suas propriedades terapêuticas (ZHONGYUAN *et al.*, 2022).

Dentre os chás, o chá verde é o mais consumido no mundo, obtido a partir da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, pertencente à família Theaceae. Antigamente, seu consumo era associado a sabores e aromas atraentes. Nos dias de hoje, este chá chama a atenção das pessoas devido ao seu poder antioxidante, podendo ser empregado como suplemento nutricional (DAS *et al.*, 2019). Muitos estudos relatam os benefícios do chá verde à saúde, auxiliando na diminuição do colesterol e na prevenção de doenças crônico-degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares. Há vários relatos que reportam também seu potencial anti-inflamatório (MAITI *et al.*, 2019).

O consumo de chá verde é maior nos países do Oriente. A maior produção de *C. sinensis* ocorre na China e na Índia, mas essa espécie já é cultivada em todo o mundo. No Brasil, o chá verde é principalmente comercializado em sachês. Um ponto interessante relatado em alguns estudos, mostra que a quantidade de compostos fenólicos presentes no chá verde brasileiro é maior do que desse vegetal cultivado em outros países. Isso ocorre devido às condições climáticas e do solo nas regiões de plantio (NISHIYAMA *et al.*, 2010).

As catequinas são as principais substâncias encontradas no chá verde, principalmente a epigalocatequina galato (EGCG), que corresponde a 50-60% da porção de catequinas no chá (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

Estudos mostraram que o consumo de 4 a 6 xícaras de chá verde ao dia equivale a 400-600mg de catequinas ao dia, e 115-300mg de EGCG. Isso pode ser benéfico para um estilo de vida saudável, prevenindo doenças, pois as catequinas fortalecem o sistema imunológico, regulam o metabolismo de glicose e lipídeos e apresentam impactos positivos no controle de obesidade e diabetes (RASHIDINEJAD

et al., 2021). A atividade antioxidante do chá verde já foi verificada em outros estudos, isto porque as catequinas são capazes de eliminar a maior parte das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) que são geradas no corpo humano durante condições infecciosas e inflamatórias (SEHGAL, 2022).

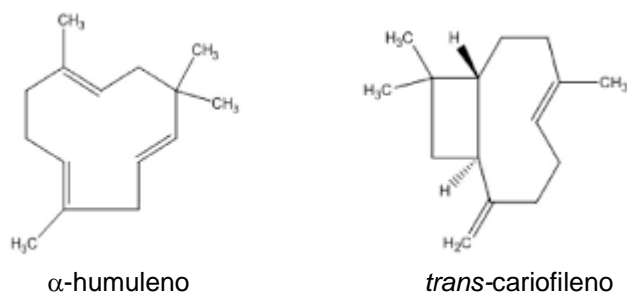
Atualmente, vem crescendo o interesse em trabalhos que relacionem o efeito biológico com as diferentes conformações de moléculas. Assim, este projeto se destinou a realizar o estudo do equilíbrio conformacional da (+)-catequina, buscando compreender os efeitos estereoeletrônicos envolvidos em cada estrutura, avaliando desta forma as diferenças dos efeitos quando se insere um grupo galato na estrutura da catequina, além de relacionar os resultados com a propriedade antioxidante de extratos de chá verde obtidos a partir de amostras de chá a granel e em sachê.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas são constituídas por carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, vitaminas e outros componentes celulares, que são chamados de metabólitos primários e são necessários para a sobrevivência e o desenvolvimento das mesmas (BARKET, 2021). Os metabólitos secundários, por sua vez, são compostos que desempenham diversas funções de interação bióticas e abióticas (NELSON; WHITEHEAD, 2021). Esses constituintes não apresentam função direta no metabolismo ou crescimento da planta, mas influenciam no seu desenvolvimento (BARKET, 2021). Existem cerca de duzentos mil metabólitos secundários já descritos, que são sintetizados pelas plantas para sua defesa, reprodução, estabelecimento de relações simbióticas e resiliência simbiótica (WU *et al.*, 2021). Muitas dessas substâncias apresentam fragrância adocicada e cores chamativas que atraem animais para realizar a polinização das flores e dispersão de sementes. Esses compostos podem ser classificados em três grupos: terpenos, compostos nitrogenados e fenólicos.

Os terpenos são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários e se configuram como uma classe importante de compostos orgânicos voláteis biogênicos. São normalmente responsáveis pelo cheiro produzido pelas plantas, constituindo principalmente os óleos essenciais (SORVARI; HARTIKAINEN, 2021). Também são utilizados como aditivos alimentares, além de serem amplamente empregados em produtos farmacêuticos devido a suas propriedades antifúngica, antioxidante e inseticida. Exemplos destes compostos são o limoneno, responsável pelo aroma da laranja e limão, o linalol, que está presente na lavanda, e o mirceno, que dá aroma ao capim-limão e ao lúpulo (AGE-HÜLSMANN *et al.*, 2021). O α -humuleno e (-)-*trans*-cariofileno (Figura 01) são sesquiterpenos do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC (*Boraginaceae*), que está presente no fitoterápico Acheflan® que é utilizado para tratamento de processos inflamatórios, como tendinite e dor causada por traumas, entorses e contusões (DA SILVA *et al.*, 2019)

Figura 1- Estrutura do α -humuleno e (-)-*trans*-cariofileno

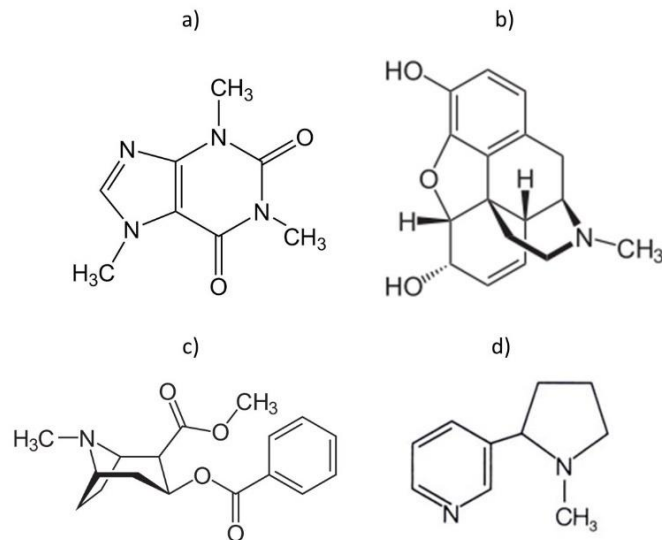
Fonte: (AZEVEDO, 2016)

Quimicamente, os terpenos são chamados de alcenos naturais. Podem apresentar diferentes funções oxigenadas e são constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8) que são ligadas umas as outras de formas diferentes. Isso leva à ocorrência também de terpenos cíclicos como o limoneno. Assim, geralmente são classificados de acordo com a quantidade de unidades de isopreno (FELIPE; BICAS, 2017).

A segunda classe de metabólitos secundários, os nitrogenados, são, muitas vezes, originados de aminoácidos, tais como os alcaloides, consistindo em mais de 12.000 compostos relatados. Caracterizam-se como estruturas que possuem anéis heterocíclicos contendo nitrogênio. Alguns destes compostos são a cafeína, morfina, cocaína, nicotina (Figura 02), apresentam atividade biológica em produtos farmacêuticos, narcóticos e venenos, como ação anti inflamatória, antioxidante, analgésica, anticâncer, atuando junto ao sistema nervoso central (SNC) (BARKET, 2021).

Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem na sua estrutura pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático. Esses compostos desempenham diversas funções nas plantas, estando relacionados ao seu crescimento e desenvolvimento, atuando, ainda, na defesa contra radiação e herbivoria (ROASA *et al.*, 2021). Como esta classe de compostos é importante para o desenvolvimento deste projeto, será abordada com mais detalhes na seção seguinte.

Figura 2- Estrutura química dos alcaloides a) cafeína b) morfina c) cocaína d) nicotina.



Fonte: A Autora

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

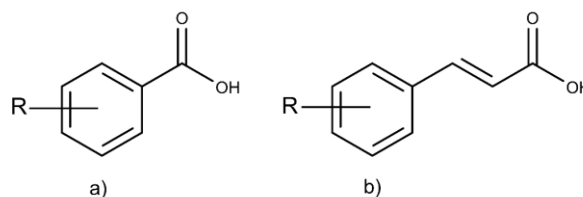
Os compostos fenólicos são uma grande classe de substâncias encontradas na natureza, consistindo em mais de 50 mil representantes já identificados (ROMAN *et al.*, 2021). Podem ser encontrados em plantas, nos seus chás, frutas e sementes. Estão associados à redução de doenças como por exemplo, o câncer (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Grande parte dos compostos fenólicos apresentam capacidade de captura de radicais livres, conferindo-lhes potencial antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Dependendo da sua estrutura molecular, podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas (MIKOŁAJCZAK *et al.*, 2021), os dois primeiros estão descritos nas próximas seções.

2.2.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos apresentam pelo menos um anel aromático e um grupo carboxila, que é responsável pela polaridade desses compostos. Podem ser classificados em ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos (Figura 03).

Figura 3- Estrutura geral de a) ácidos hidroxibenzoicos e b) hidroxicinâmicos. R=OH



Fonte: O Autor

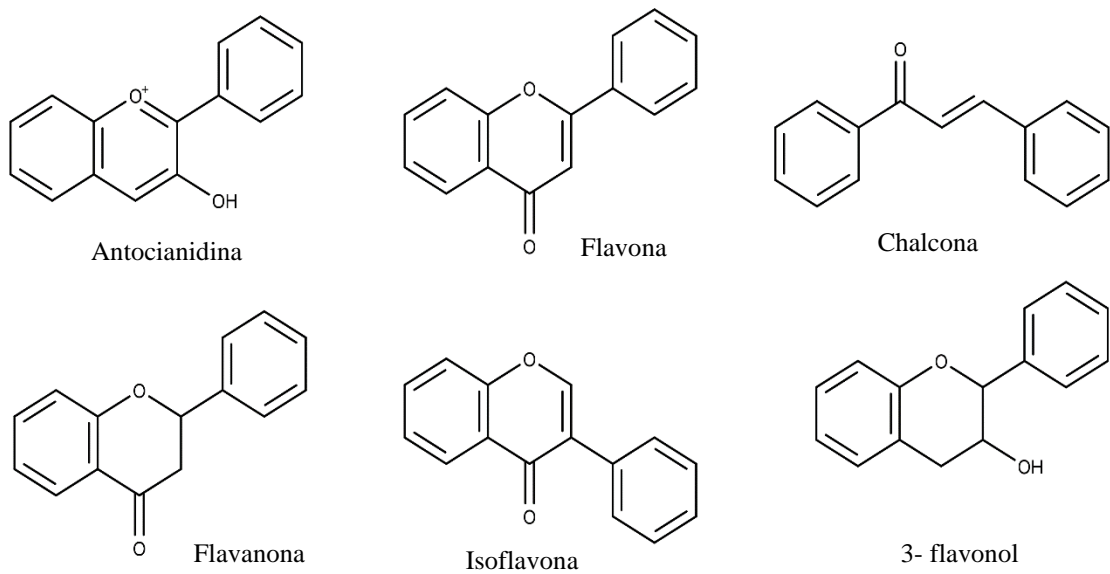
Os ácidos fenólicos apresenta grande interesse farmacológico, são conhecidos como fortes antioxidantes naturais, e podem ter grande potencial anti-inflamatório, anticancerígeno, antimicrobiano, antialérgico, antiviral, antitrombótico, hepatoprotetor, aditivo alimentar, sinalizador de moléculas, entre outros (MARCUCCI *et al.*, 2021) (KUMAR; GOEL, 2019).

2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides pertencem ao grupo dos fenólicos, sendo constituídos por uma estrutura do tipo C6-C3-C6 (dois anéis aromáticos que são interligados por uma estrutura de três carbonos). Apresentam sutil diversidade estrutural que leva a compostos de diferentes classes, como antocianidinas, flavonas, chalconas, isoflavonas, flavanonas, 3-flavanóis, entre outros (Figura 04) (SOARES, 2002).

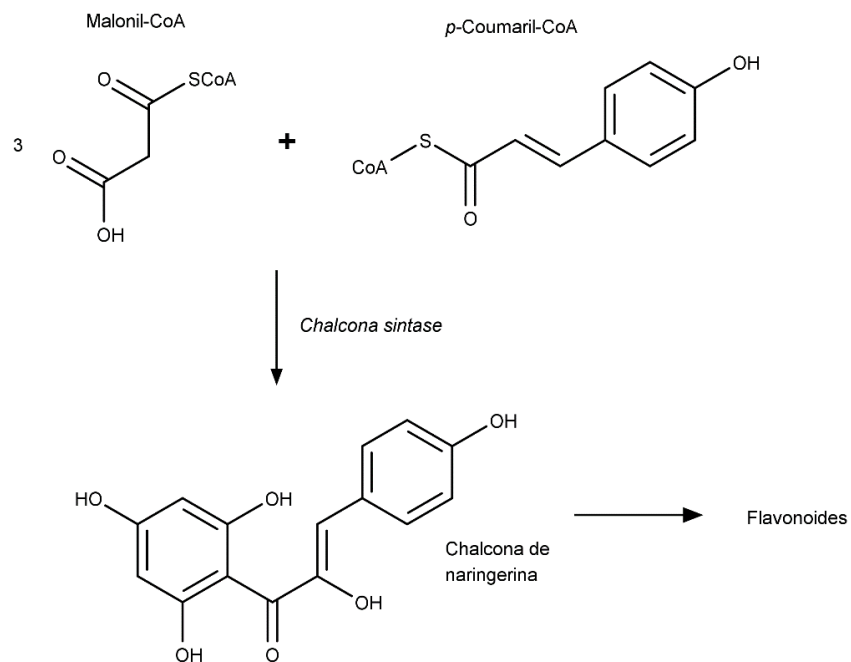
As antocianidinas estão presentes em flores e frutas, e os compostos mais abundantes dessa classe são a cianidina, a delphinidina e a peomidina. As flavonas são encontradas em frutas cítricas, sendo a hesperidina e a naringerina os principais representantes. As chalconas são precursores biossintéticos de flavonoides, como a chalcona de naringerina que está presente na condensação de malonil-CoA com *p*-coumaril-CoA (Figura 05). As isoflavonas estão em legumes como a soja, e seus principais exemplos são a daidzeína e a genisteína. Os 3-flavanóis estão presentes principalmente em frutas, chás e lúpulo. Os principais exemplos são as catequinas e epicatequinas (DA SILVA *et al.*, 2015; AVALOS; PÉREZ, 2009).

Figura 4- Esqueleto básico das Classes de flavonoides.



Fonte: O Autor

Figura 5- Representação esquemática da biossíntese de flavonoides.



Fonte: A Autora

Essas diferentes formas estruturais (Figura 04) conferem aos flavonoides diversas funções biológicas. Eles podem exercer funções para as plantas, como defesa contra raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, ação antioxidante e inibição enzimática (MACHADO *et al.*, 2008).

Esses compostos apresentam propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, entre outras. Os flavonoides podem agir diminuindo a circulação do colesterol LDL no organismo e diminuindo a oxidação lipídica de membrana (REGINATO; HAAS; BAUERMANN, 2015). Essas diversas funções estão relacionadas com o tipo de estrutura dos flavonoides, cuja biossíntese depende do estágio em que a planta se encontra.

Algumas fontes de flavonoides são cebola, maçã, uva, bebidas fermentadas, como cerveja e vinho tinto, além do café, e especialmente os chás, que contêm catequinas em sua composição (LORDÉLO *et al.*, 2010).

2.3 CHÁ VERDE

O chá verde é proveniente das folhas de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze que é um arbusto pertencente a família Theaceae. É nativo da China, porém é cultivado no mundo todo (Figura 06) (PEREIRA *et al.*, 2014).

A partir das folhas de *C. sinensis*, podem ser produzidos alguns tipos de chás, que variam apenas na forma de fabricação, como o chá branco, que não passa pelo processo de fermentação e é feito com o broto da planta. O chá verde também não passa pelo processo de fermentação. O chá vermelho é parcialmente fermentado e o chá preto fermentado (FIRMINO; MIRANDA, 2015).

Figura 6- Foto da espécie *Camellia sinensis* (L.) Kuntze.



O processo para obtenção do chá branco começa diferenciando-se na etapa de colheita, pois é separada a maior proporção de brotos que possuem uma camada prata, o que caracteriza a coloração do chá. Após a colheita, as folhas são submetidas a aquecimento em água para não passar pelo processo de fermentação. Suas folhas

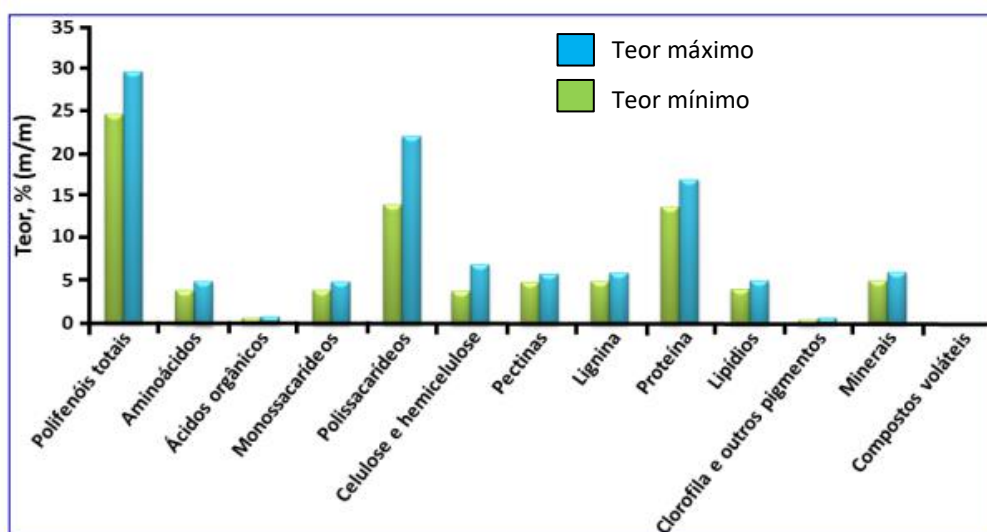
são secas naturalmente, preservando o teor de fenólicos da planta (PEREIRA *et al.*, 2014).

O chá verde também passa por aquecimento logo após a colheita. Porém, é feito com as folhas mais maduras que o chá branco. Depois de aquecidas, as folhas são levadas para secagem para preservar sua coloração e seus constituintes (PEREIRA *et al.*, 2014). Isto evita a fermentação das catequinas, mantendo os polifenóis em suas formas monoméricas e protegendo as vitaminas contra a degradação enzimática (SENANAYAKE, 2013).

O chá vermelho (*oolong*) é conhecido por ser parcialmente fermentado, a fermentação é interrompida pelo processo de aquecimento das plantas, até apresentar a coloração vermelha (CAMARGO *et al.*, 2016). O chá preto, por sua vez, passa por processo total de fermentação após a colheita. A fermentação está associada ao processo de escurecimento, induzido por enzimas oxidativas que estão presentes nas folhas do chá, como a *polifenol oxidase*. Em seguida, o material é levado para secagem (PEREIRA *et al.*, 2014).

Os compostos presentes nos chás, incluem desde alcaloides como cafeína, teobromina e teofilina, flavonoides como polifenóis, catequinas e taninos, até ácidos orgânicos como ácido cítrico, oxálico, málico, fumárico, entre outros (KOWALSKI *et al.*, 2019). Algumas classes de compostos presentes no chá verde estão demonstradas na Figura 7 a seguir:

Figura 7- Composição química do chá verde.

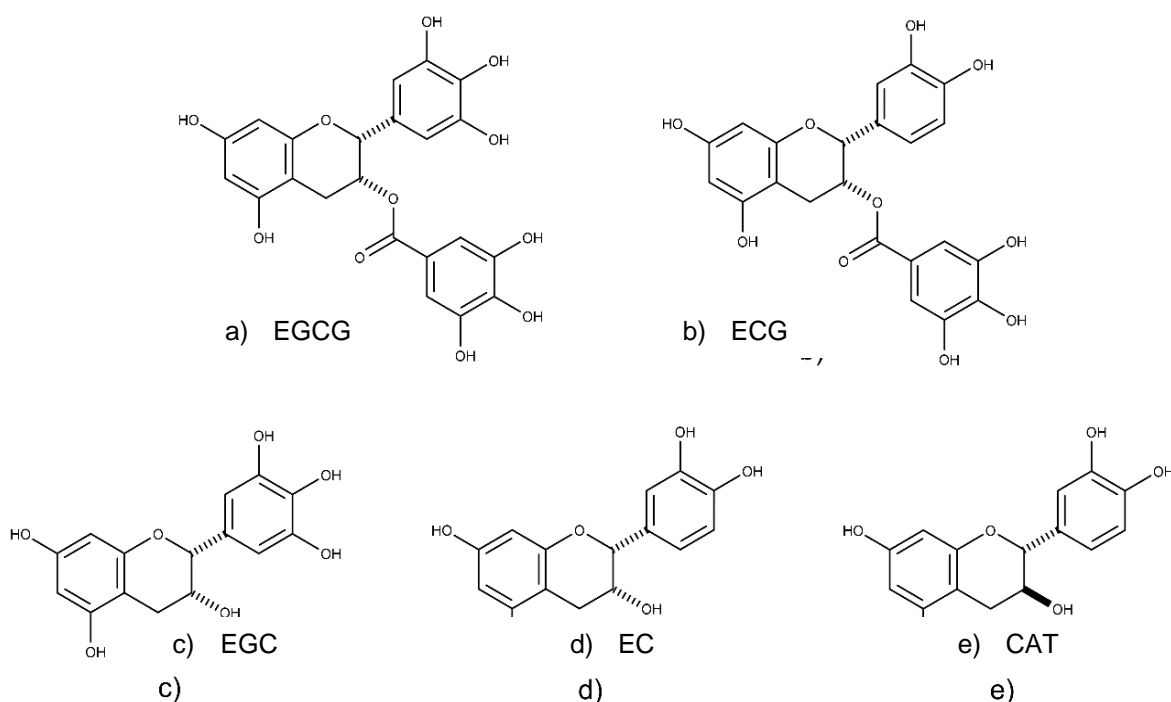


Fonte: (DINIZ, 2013)

A composição química dos chás são dependentes de fatores como, clima, estação do ano, tipo de planta, idade e o processo de horticultura utilizado. Os polifenóis representam cerca de 30% da massa seca do chá (LAMARÃO; FIALHO, 2009).

Os flavonoides de maior predominância nos chás de *C. sinensis* são as catequinas, e existem alguns derivados de catequinas como: a) (-)-epigalocatequina galato (EGCG), b) (-)-epicatequina galato (ECG), c) (-)-epigalocatequina (EGC), d) (-)-epicatequina (EC) e e) (+)-catequina (CAT) (KODAMA *et al.*, 2010). Suas estruturas estão apresentadas na Figura 08.

Figura 8- Derivados de catequina.



Fonte: A Autora

As catequinas foram isoladas do chá verde e suas estruturas foram determinadas na década de 1930. São os principais constituintes sólidos contidos no chá que são extraídos em água quente. Na bebida preparada com cerca de 1g de folhas secas para 100mL de água, aproximadamente 35-45mg são catequinas. Podem ser extraídas com acetato de etila a partir do extrato aquoso e separadas por cromatografia (LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001).

As catequinas são antioxidantes que proporcionam a captura de espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que atacam o DNA, proteínas e lipídeos do nosso organismo, podendo causar diversas doenças degenerativas como danos ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (PEREIRA *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2016).

O processo de fermentação utilizado na produção do chá vermelho e chá preto faz com que as catequinas sejam oxidadas ou condensadas, formando dímeros ou polímeros de teaflavinas. Alguns estudos mostraram que a atividade antioxidante é mais eficaz quando as catequinas estão presentes em suas formas monoméricas. Assim, os chás brancos e verdes tem maior poder de captura de radicais do que os chás vermelhos e pretos (CAMARGO *et al.*, 2016).

A estabilidade das catequinas presentes no chá verde depende do pH, concentração de oxigênio, temperatura e força iônica. A CAT é estável em pH<7. A EGCG e EGC são degradadas em pH maior que 7,4. Já a ECG é degradada em pH 11,2 e a EC é estável entre pH 1,8- 11,2 (LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001).

Outro composto encontrado no chá verde é a cafeína, a qual representa cerca de 2 a 5% da composição total do chá, semelhante ao teor encontrado nos grãos de café. Essa composição não é alterada no tipo de processamento pelo qual as folhas passam. Logo, tanto no chá branco, verde, vermelho e preto esta proporção é mantida (SENANAYAKE, 2013).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Muitas doenças, como vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e desordens inflamatórias podem estar relacionadas com o estresse oxidativo que é causado pelo desequilíbrio entre espécies antioxidantes e compostos oxidativos, como radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) no nosso organismo (LORDÊLO *et al.*, 2010).

Normalmente, essas patologias se desenvolvem por alterações oxidativas de moléculas como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (LORDÊLO *et al.*, 2010). O organismo humano possui antioxidantes capazes de neutralizar alguns radicais livres, como alguns sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalases, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (glutathione, bilirubina, hormônios sexuais estrogênicos, o ácido úrico, a coenzima Q, melanina, melatonina e o ácido lipoico). Porém, esta

quantidade normalmente não é suficiente e é necessário obter espécies antioxidantes a partir da dieta com fontes de compostos fenólicos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Há muitos estudos sobre substâncias antioxidantes naturais na alimentação. Para cosméticos e produtos farmacêuticos os extratos de ervas aromáticas, chás, uvas e citros são as fontes de antioxidantes mais conhecidas e estudadas (LORDÊLO *et al.*, 2010).

Muitos cosméticos possuem antioxidantes em sua formulação, pois a produção de radicais livres é um dos fatores que provocam o envelhecimento da pele, a partir da danificação celular. Muitas pesquisas de formulações e cosméticos já comercializados possuem antioxidantes naturais com extratos de plantas, por exemplo de chá verde, alecrim, semente de uva e mirtilo (MARTINY *et al.*, 2021)

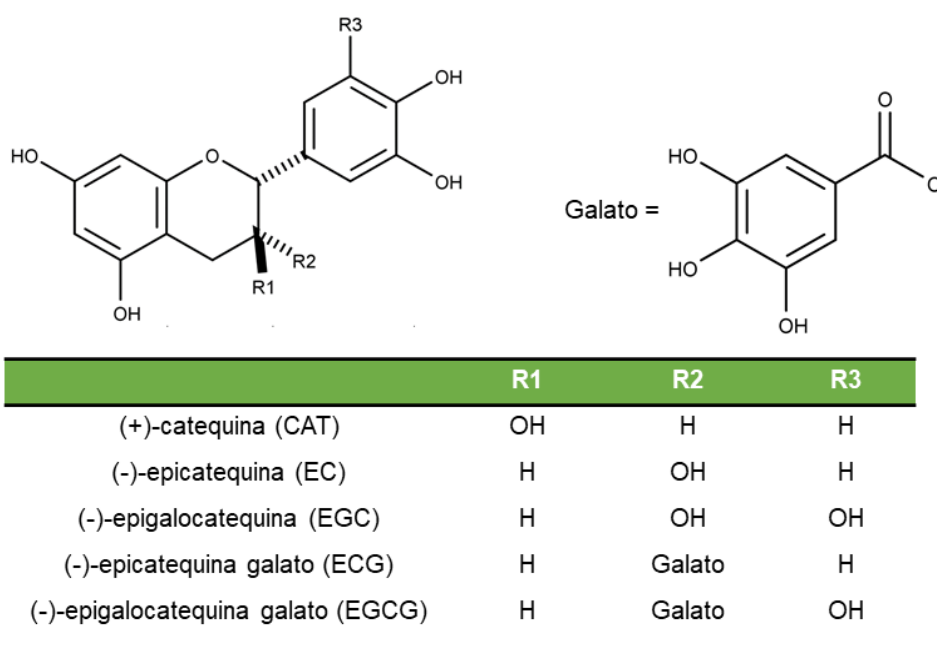
Os flavonoides agem como antioxidantes eliminando espécies reativas de oxigênio (ROS), bloqueando o efeito dessas substâncias no nosso organismo. O processo pelo qual a atividade antioxidante, a partir da ingestão de alimentos específicos é desencadeada, ocorre devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, inibição da peroxidação lipídica, eliminação de radicais livres e redução da oxidação de íons metálicos. Nestas situações o que acontece é a transferência de hidrogênio ou elétrons do composto antioxidante para o radical livre (ZHAOMING *et al.*, 2020).

Nos compostos fenólicos ocorre o efeito de conjugação entre os elétrons π do anel aromático e o oxigênio da hidroxila ligada diretamente a este anel. Isto faz com que os pares de elétrons isolados do oxigênio interajam com os elétrons do benzeno, enfraquecendo a ligação do oxigênio com o hidrogênio. Assim, o hidrogênio fica mais susceptível a reações, ligando-se aos radicais. Em geral, a capacidade antioxidante para eliminar os radicais livres depende do número de hidroxilas presentes na estrutura do composto e da estabilidade dos radicais de oxigênio (ZHAOMING *et al.*, 2020).

A atividade antioxidante de catequinas pode ser avaliada por meio de radicais hidroxila, ânions superóxido e também radicais maiores, como o 1,1- difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) e o 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico) (ABTS). O DPPH e o ABTS avaliam melhor a atividade de eliminação de radicais de catequinas galatadas como a EGCG e a ECG, pois seus grupos volumosos contribuem para o efeito estérico em radicais maiores que os substituintes hidroxila e superóxido (LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001).

Os grupos *orto*-trihidroxi, o grupo éster de 3-galato e as hidroxilas nas catequinas (Figura 09) são importantes na eliminação de radicais e prevenção da destruição oxidativa de compostos biológicos. Durante a fermentação do chá, ocorre a destruição do grupo *o*-trihidroxi. Isso pode explicar a melhor atividade antioxidante do chá verde quando comparado com os chás vermelho e preto (LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001).

Figura 9- Diferenças estruturais na classe de catequinas.



Fonte: A Autora

2.5 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Diversos estudos teóricos tem sido feitos para avaliar o comportamento de flavonoides em atividades biológicas e seu efeito antioxidante. Para isto, é importante saber qual é a conformação mais estável da molécula para verificar os comprimentos de ligações, ângulos diedros, frequências vibracionais, distribuição eletrônica, potenciais de ionização, afinidades eletrônicas e constantes de acoplamento (ROZADA, 2015; FARIAS; COSTA; MARTINS, 2021).

Para determinação da estabilidade de uma estrutura, podem-se classificar as interações de acordo com os efeitos estéricos que são causados a partir de substituintes volumosos nos anéis aromáticos, efeitos eletrônicos que são gerados a partir da diferença de eletronegatividade entre os grupos, além da presença de ácidos

e bases de Lewis que podem sofrer a interação por ligações de hidrogênio e complexos intra e intermoleculares (CESARIN-SOBRINHO; FERREIRA; BRAZ-FILHO, 2001).

O método da Teoria Funcional de Densidade (DFT- *Density-functional theory*) tem sido muito utilizado para a análise conformacional de flavonoides, como os 3-flavanóis, apresentando resultados precisos e com baixo custo computacional. Com o método do DFT podemos avaliar parâmetros como entalpia de dissociação da ligação de hidroxilas, afinidade de prótons e entalpia de transferência de elétrons, podendo relacionar suas propriedades estruturais com o potencial antioxidante da molécula (ANITHA *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consiste em realizar a extração e isolamento dos compostos fenólicos do chá verde, com ênfase para as catequinas, e caracterizar e executar testes de atividade antioxidante e da viabilidade celular dos compostos obtidos. Paralelamente, realizar cálculos teóricos para a molécula de (+)-catequina, para identificar como a mesma se comporta no espaço e determinar suas conformações mais estáveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a infusão em água de amostras de chá verde obtidas em sachê e a granel;
- Isolar os compostos fenólicos dos extratos obtidos a partir de extração com acetato de etila;
- Identificar os compostos obtidos por espectrometria de massas;
- Caracterizar o extrato por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Avaliar o teor de fenólicos das amostras obtidas;
- Avaliar o teor de flavonoides das amostras obtidas;
- Realizar o ensaio de atividade antioxidante pelo método de DPPH, ABTS e íons Ferro com as amostras obtidas;
- Avaliar a viabilidade celular de fibroblastos frente a amostra obtida;
- Fazer estudos conformacionais para avaliar as conformações mais estáveis da (+)-catequina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES QUÍMICOS

Acetonitrila grau HPLC, álcool metílico grau HPLC, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), reagente de Folin-Ciocalteu, 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) - (ABTS) foram adquiridos da Sigma- Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Acetato de etila, álcool etílico e ácido clorídrico 37% adquiridos da Anidrol (Diadema, SP, Brasil). Ácido gálico, sulfato de sódio anidro, carbonato de sódio, ácido ascórbico, sulfato férrico e ácido fórmico foram adquiridos de Synth (Diadema, SP, Brasil). Nitrito de sódio, cloreto de alumínio hexahidratado, hidróxido de sódio, persulfato de potássio, dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil). Fenantrolina foi adquirida da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

4.2 MATERIAL VEGETAL

Os sachês para obtenção dos chás foram adquiridos em supermercado da região de Ponta Grossa, PR, Brasil. Foram utilizados três lotes diferentes para realizar as infusões, sendo da mesma marca e as amostras foram homogeneizadas. O material vegetal dos sachês foi obtido no município da Fazenda Rio Grande, PR, Brasil, as coordenadas geográficas são latitude: 25° 39' 31" Sul, longitude: 49° 18' 32" Oeste.

O material vegetal comercializado na forma granel, foi obtido em casa de produtos naturais da região de Ponta Grossa, PR, Brasil. A amostra foi triturada em liquidificador para obtenção da infusão.

4.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO CHÁ VERDE

A extração dos compostos fenólicos foi realizada por infusão do chá verde, provenientes das folhas de *C. sinensis*, tanto das amostras em sachê quanto das amostras a granel, de acordo com Das e Eun (2018) utilizando banho de ultrassom Kondortech modelo CD- 4820, série LUS20050736, potência 150W/ 170W, 50/ 60Hz. As infusões foram realizadas na proporção 1:100 (amostra: água, m/v). As amostras foram deixadas em agitação durante 20 minutos a 60 °C no banho de ultrassom. Após este processo, foi realizada a filtração em papel filtro e o resfriamento dos extratos obtidos a temperatura ambiente.

Para a obtenção dos flavonoides das amostras, as infusões obtidas após filtração foram acidificadas a pH 2, utilizando-se HCl 6 mol/L (DAS *et al.*, 2020). Em seguida, foram realizadas cinco extrações com acetato de etila em uma proporção de 1:1 (v/v). A parte superior, fase orgânica, foi seca em sulfato de sódio anidro, e filtrada utilizando papel filtro. As amostras obtidas foram levadas para evaporação do solvente utilizando rotaevaporador Fisatom modelo 550, série 001464, potência 1200W, obtendo-se a fração de flavonoides dos extratos de chá verde.

Na sequência estão descritas as metodologias empregadas para determinação do teor de fenólicos e flavonoides para ambas amostras de chá verde (sachê e granel).

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de fenólicos totais nas amostras de chá foram realizadas a partir do método adaptado de Folin-Ciocalteu (CAMARGO *et al.*, 2016). Foram utilizados 100 µL de amostras na concentração de 100 ppm, que foram adicionadas em placas de 96 poços com 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 10%. Depois de cinco minutos, foram adicionados 100 µL de solução de carbonato de sódio 7% em todos os poços e aguardou-se 30 minutos para que a reação pudesse ocorrer. Após esse tempo, foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro de Microplacas Biotek modelo Epoch em 765 nm.

A curva de calibração foi feita com ácido gálico por ser um padrão para compostos fenólicos, assim as concentrações das amostras foram obtidas pela equação resultante da curva de calibração de ácido gálico, e os resultados são expressos como mg/g de ácido gálico.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para se determinar o teor de flavonoides nas amostras, foi utilizado um método colorimétrico, adaptado de CHLOPICKA, PASKO, *et al.* (2012). Foram utilizados 100 µL das amostras a 100 ppm em solução de etanol. Em seguida, foram adicionados 50 µL de NaNO₂ 5% (m/v) e deixou-se em repouso durante 6 minutos. Na sequência, adicionaram-se 75 µL de solução de AlCl₃.6H₂O 2% (m/v) e após 5 minutos, foram adicionados 75 µL de NaOH 1mol/L. A solução foi mantida em repouso por 10 minutos e a absorbância foi medida no espectrofotômetro de ELISA a 510 nm. A curva foi

construída utilizando-se o padrão de catequina e os resultados expressos em mg equivalente de catequina.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Atividade Frente ao Radical DPPH

Inicialmente, foram preparadas as soluções etanólicas de DPPH a 25 ppm e das amostras de chá verde a granel e em sachê a 100 ppm. Essas soluções foram inseridas em uma placa de 96 poços e foram feitas diluições das amostras para 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,12 ppm, 1,56 ppm, 0,78 ppm, 0,39 ppm e 0,09 ppm. A placa foi deixada em repouso durante 30 minutos e protegida da luz. Decorrido esse tempo, foi realizada a medida da absorbância no espectrofotômetro de ELISA a 517 nm. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico nas concentrações de 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,50 ppm, 31,25 ppm, 15,62 ppm e 7,81 ppm. Este procedimento foi adaptado de Yen e Chen (1995).

4.6.2 Atividade Frente ao Radical ABTS

A análise pela metodologia do ABTS determina a capacidade dos compostos antioxidantes de capturar o cátion $ABTS^+$. Inicialmente, foi preparada uma solução de ABTS com persulfato de potássio, que foi incubada isolada da luz durante 48 horas. Após isso, formou-se o radical, $ABTS^{\bullet+}$. Em seguida, a solução contendo o radical foi diluída em etanol até obter absorbância de 0,70 em 735 nm. As amostras de chá foram preparadas em soluções de etanol em seis concentrações, sendo elas 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm e 3,125 ppm. Foram adicionadas na placa de 96 poços 100 μ L de cada amostra com 100 μ L da solução do radical. A absorbância foi lida a 734 nm após 30 minutos. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico (RUFINO *et al.*, 2007).

4.6.3 Avaliação do Poder Redutor de Ferro

Inicialmente, foi obtido o complexo de Fe (III) com fenantrolina, adicionando-se solução etanólica de sulfato férrico com solução etanólica de fenantrolina. Após isso, foram inseridos em placas de 96 poços, 100 μ L do complexo e 100 μ L das amostras de chá verde a granel e em sachê totalizando 100 ppm. Como padrão para montar a curva de calibração, foi utilizado o ácido ascórbico com o complexo de Fe (III) nas

seguintes concentrações: 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm e 0 ppm. Posteriormente, a placa foi incubada durante 5 minutos e a leitura da absorbância foi feita em 510 nm. Este procedimento foi adaptado de Christodouleas *et al.* (2014).

4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT

As células utilizadas foram fibroblastos de camundongo linhagem 3T3, que foram cultivadas em meio DMEM com 10 % de soro fetal bovino (SFB). Elas foram semeadas em em placas de 96 poços com a concentração de 2×10^5 células/poço e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5 % de CO₂ durante 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se na placa o extrato de chá verde em sachê nas concentrações de 5, 1, 0,5, 0,250, 0,125, 0,075 e 0,050 mg/mL. Estas concentrações foram obtidas a partir da diluição do extrato em meio DMEM com 10 % de SFB. As células com as amostras foram incubadas por 24 e 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Após este período o sobrenadante foi retirado e foi adicionado às células uma solução de MTT. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora isolado da luz. Em seguida, foram solubilizados os cristais de formazan utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), e foi feita a leitura da absorbância em 570 nm em um leitor de placas. Como controle negativo foi utilizado meio DMEM, e a viabilidade celular foi obtida pela comparação entre as células do controle negativo com os extratos.

4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

4.8.1 Análise por Espectrometria de Massas

Para esta análise foi utilizado o espectrômetro de massas modelo Acquity Xevo TQD, Waters, com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo e foi operado em modo de ionização negativa, ESI(-)-MS. Foi utilizada a voltagem do capilar de 4000 V e do cone de 45 V, temperatura de solvatação 600 °C, fluxo de gás de solvatação 650 L/h, e energia de colisão de massas 15 V.

Para verificar os compostos predominantes nas amostras foi feita varredura em modo de ionização positiva e negativa de 100-1500 m/z. Os íons de maior relevância foram selecionados e realizou-se uma varredura de cada composto selecionado para encontrar os íons filhos dos mesmos.

4.8.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear

Foi realizada a caracterização do extrato de chá verde em sachê por RMN ^1H no espectrômetro de ressonância magnética nuclear, marca BRUKER, 400 MHz, modelo AVANCE III. Foram utilizados 20 mg de amostra solubilizada em 0,7 mL de metanol- d_4 , em 25 °C. O equipamento pertence ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) na UEPG.

4.9 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Foi realizada a análise conformacional da (+)-catequina a partir de cálculos computacionais utilizando o pacote de programas GAUSSIAN 09 e o programa de visualização molecular Gauss-View 6.0.16 para obter as conformações mais estáveis do composto. Primeiramente, foram realizados cálculos de *scan*, rotacionando os ângulos diedros presentes na (+)-catequina em 36 passos de 10° cada, utilizando o nível de teoria M06-2X/6-31G. Assim, obtiveram-se as energias de cada conformação por um gráfico de superfície de energia potencial (SEP), sendo possível identificar as estruturas de menor energia.

Após avaliar os resultados de *scan*, foram feitos cálculos de otimização e frequência, utilizando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p), onde são feitos ajustes nas conformações, confirmando as estruturas mais estáveis.

Os cálculos de orbitais naturais de ligação (NBO) foram realizados a fim de se identificar os efeitos hiperconjugativos presentes nos confôrmeros, que influenciam no equilíbrio conformacional.

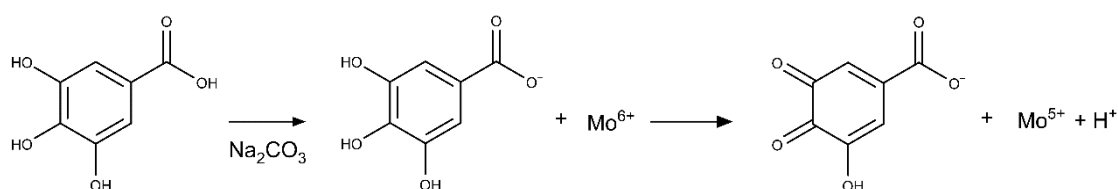
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das infusões, obteve-se rendimento de material seco de 4,00% para o chá a granel e 3,96% para o chá em sachê. No estudo de Das *et al.* (2020), foi realizada a extração de chá a granel via ultrassom, e posteriormente com acetato de etila, obtendo-se rendimento de 3,00%. Estes materiais foram utilizados nos experimentos seguintes.

5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Esta análise é baseada na reação de oxidação dos fenólicos em meio alcalino pelos oxidantes inorgânicos presentes no reagente Folin-Ciocalteu, que são os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico. O meio alcalino faz com que os fenólicos percam um próton, reduzindo o reagente de Folin-Ciocalteu e formando óxido de molibdênio (Figura 10). Estes óxidos absorvem luz na região de 765 nm, apresentando a coloração azul. Assim, é possível quantificar a amostra pela intensidade da coloração azul. Contudo, esse método não é específico para compostos fenólicos, uma vez que a reação pode ocorrer com outros compostos redutores (PIRES *et al.*, 2017).

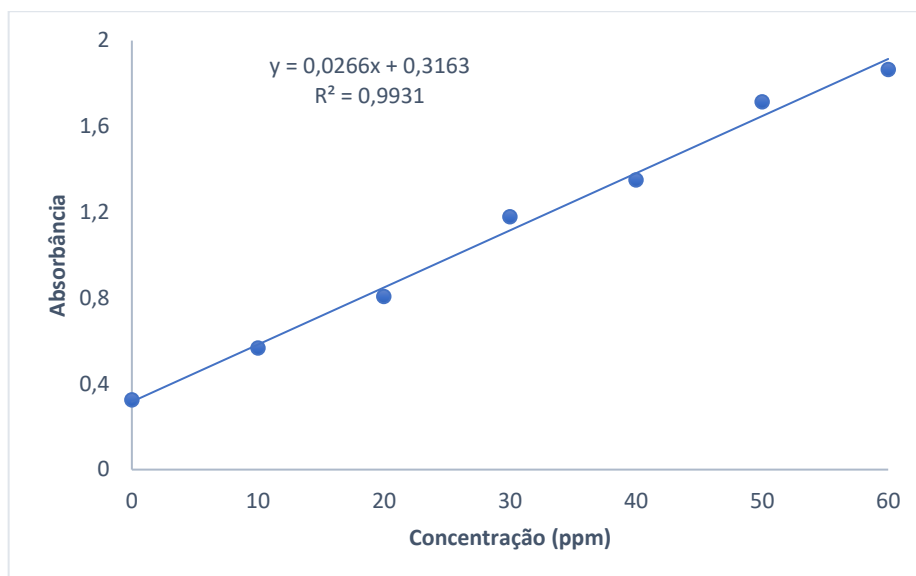
Figura 10- Equação da Reação de Folin-Ciocalteu com ácido gálico.



Fonte: A Autora

A partir dos resultados obtidos da absorbância utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, considerando as concentrações do padrão de ácido gálico utilizado, obteve-se o gráfico da curva padrão (Figura 11). A mesma será utilizada para encontrar a concentração de fenólicos nas amostras, pois o ácido gálico é um metabólito que apresenta características parecidas com os compostos fenólicos do chá verde. Assim, determinou-se a concentração de amostras desconhecidas a partir da concentração de amostras semelhantes conhecidas.

Figura 11- Curva do padrão de ácido gálico.



Fonte: A Autora

A partir da equação obtida com o gráfico da Figura 11, foi calculada a concentração de fenólicos nas amostras de chá a granel e em sachê, obtendo-se os resultados mostrados na Tabela 01.

Tabela 1-Teor de fenólicos e erro experimental

CHÁ	TEOR DE FENÓLICOS (%)	ERRO (%)
GRANEL	49,93	2,24
SACHÊ	49,96	4,58

Fonte: A Autora

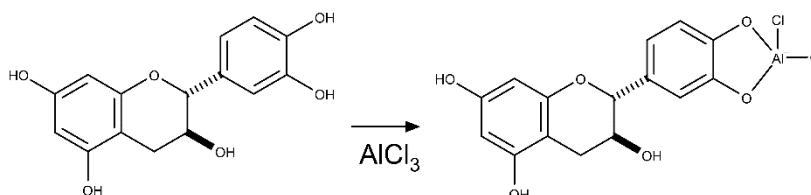
O teor de compostos fenólicos para o chá verde a granel foi de 499,3 mg de ácido gálico/g de amostra e para o chá verde em sachê 499,6 mg de ácido gálico/g de amostra. Portanto, evidenciou-se que cerca de 50 % da massa de ambas as amostras são compostos fenólicos. Isto sugere que a diferença de processamento entre as duas amostras não interferiu no teor de fenólicos totais. Sendo assim, optou-se por realizar a medida do teor de flavonoides das amostras para identificar o teor de catequinas presentes.

5.2 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoides nas amostras foi determinado pela técnica espectrofotométrica de cloreto de alumínio, caracterizado pela complexação do alumínio com os flavonoides (Figura 12). Essa é evidenciada pelo surgimento da

coloração vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração total dos flavonoides presentes na amostra. O cloreto de alumínio é seletivo para flavonoides, fazendo a diferenciação entre os outros compostos fenólicos, pois forma complexo estável de cor vermelha entre os cátions de Al^{3+} e as hidroxilas livres nas moléculas. Assim, a intensidade da coloração vermelha é proporcional à quantidade de flavonoides presentes na amostra (MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2021).

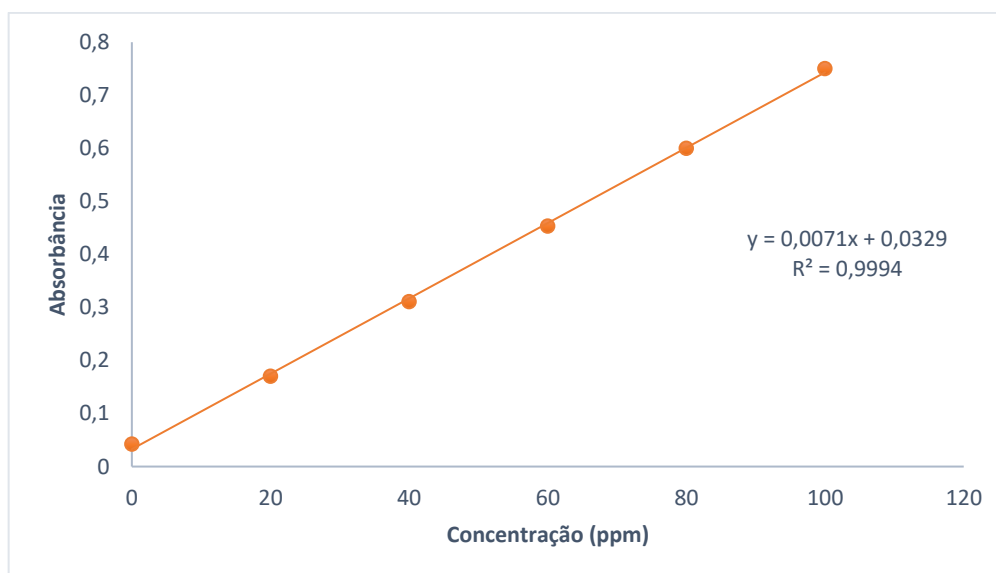
Figura 12- Reação da (+)-catequina com cloreto de alumínio.



Fonte: A Autora

A curva obtida para o padrão de (+)-catequina está demonstrada no gráfico a seguir (Figura 13) de absorbância em função da concentração de catequinas.

Figura 13- Curva do padrão de catequina



Fonte: A Autora

A partir da equação da reta obtida, foram obtidas as concentrações de flavonoides nas amostras de chá a granel e em sachê, estes valores estão apresentada na Tabela 02.

Tabela 2- Teor de flavonoides das amostras de chá a granel e sachê com erro experimental calculado

	TEOR DE FLAVONOIDES (%)	ERRO (%)
GRANEL	39,11	0,88
SACHÊ	58,80	2,44

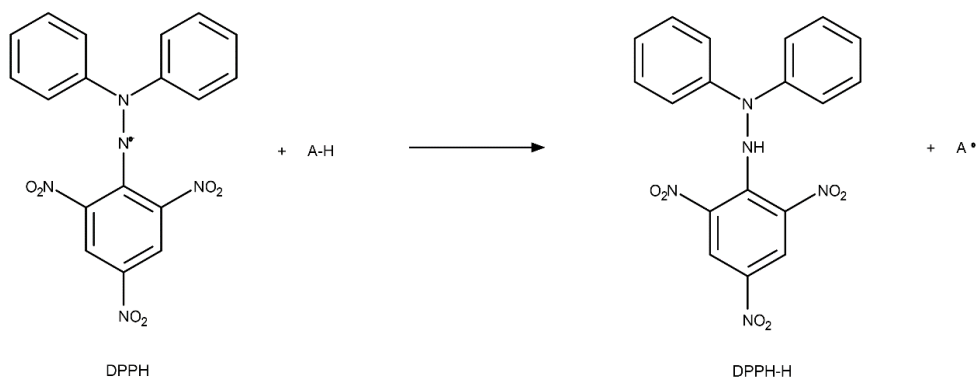
Fonte: A Autora

Estes resultados podem ser apresentados como 391,13 mg de catequina/ g de amostra para o granel e 588,03 mg de catequina/ g de amostra para o sachê. A partir do teor de flavonoides encontrado, observa-se que apesar de ambas as amostras apresentarem valores muito próximos de teor de fenólicos, o teor de flavonoides da amostra a granel é 19,69% maior que o teor de flavonoides na amostra em sachê em relação a massa de catequina que foi utilizada como padrão. Considerando a massa de ácido gálico que foi o padrão utilizado para o teor de fenólicos, para a amostra em sachê de 49,96% de fenólicos, 34,46% são flavonoides, já para a amostra a granel, de 49,93% de fenólicos, 22,92% são flavonoides. Assim, espera-se que a quantidade de ácidos fenólicos na amostra a granel seja maior e a proporção de flavonoides no sachê seja maior, o que pode ser constatado utilizando-se cromatografia líquida.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH

Este método utiliza a redução do radical DPPH pela substância antioxidante, nesta reação ocorre a doação de um hidrogênio oriundo da substância antioxidante (A-H) para o radical DPPH, como mostrado na Figura 14. Essa transferência de hidrogênio faz com que o radical, que absorve energia na região de 515-517 nm, passe da coloração púrpura para a coloração amarela. Então, a diminuição da absorbância reflete em maior capacidade antioxidante do composto.

Figura 14- Equação da Reação geral entre o radical DPPH• e uma substância antioxidante (A-H).



Fonte: A Autora

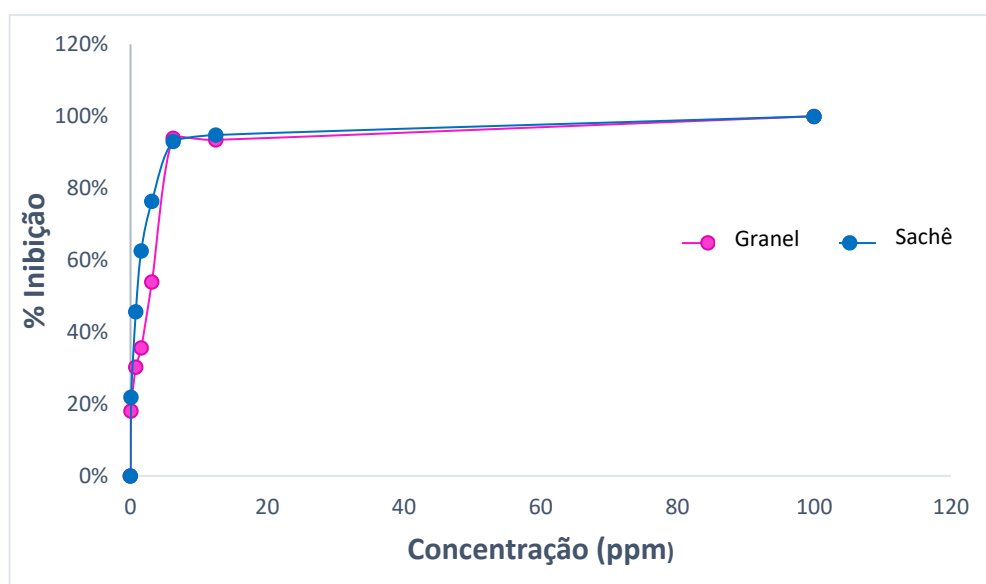
A partir do valor de absorbância exibido pelas amostras a granel e em sachê, obtém-se o valor da porcentagem de inibição a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = [1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}})] \times 100$$

(OLIVEIRA, 2015)

De posse desses valores, foi feito o gráfico de porcentagem de inibição em função da concentração de amostra em ppm, mostrado na Figura 15.

Figura 15- Gráfico da porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras de chá verde (granel e sachê).



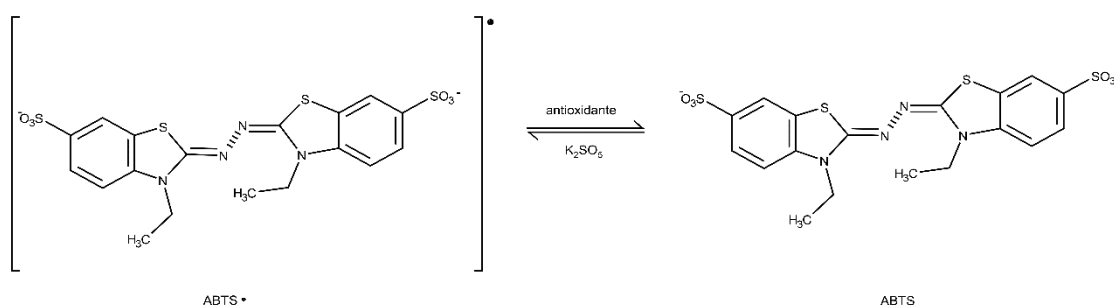
Fonte: A Autora

Pela análise do gráfico da Figura 15, pode-se constatar que ambas as amostras do chá inibiram o radical DPPH de maneira similar. A partir dos dados reportados neste trabalho, foi possível obter o IC₅₀ das amostras. Quanto menor o IC₅₀, maior é a atividade antioxidante. Para o chá a granel, o valor observado foi de 2,713 ppm e para o sachê, 1,039 ppm. Assim, pode-se observar que o potencial antioxidante do chá verde em sachê obtido pelo método do radical DPPH é maior que do chá a granel. Este resultado era esperado devido ao maior teor de flavonoides encontrados no chá em sachê. Um estudo envolvendo extratos de chá mate em sachê e a granel (CAZAL, 2019) apresentou resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, com a atividade antioxidante pelo método de DPPH, e os autores também avaliaram as amostras pelo método ABTS e nestes casos as atividades antioxidantes foram maiores para o extrato de sachê comparado ao granel.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL ABTS

O cátion radical ABTS é formado a partir da reação entre ABTS e persulfato de potássio, com absorção máxima de energia em 645, 734 e 815 nm. A inibição é determinada pela mudança de coloração azul para incolor, (Figura 16) que é medida pela absorbância, em função da concentração das amostras (JAISWAL, 2020).

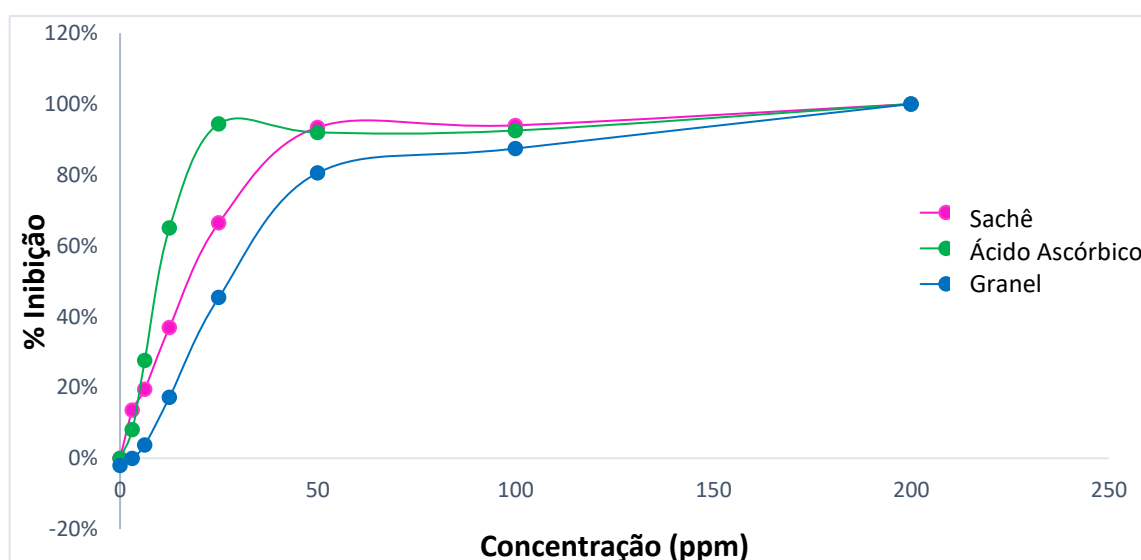
Figura 16- Estabilização do radical ABTS●+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: A Autora

Após a medida de absorbância, calcularam-se as porcentagens de inibição para se construir o gráfico (Figura 17) de porcentagem de inibição em função da concentração da amostra em ppm.

Figura 17- Gráfico da porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras de chá verde (granel e sachê) e do padrão ácido ascórbico.



Fonte: A Autora

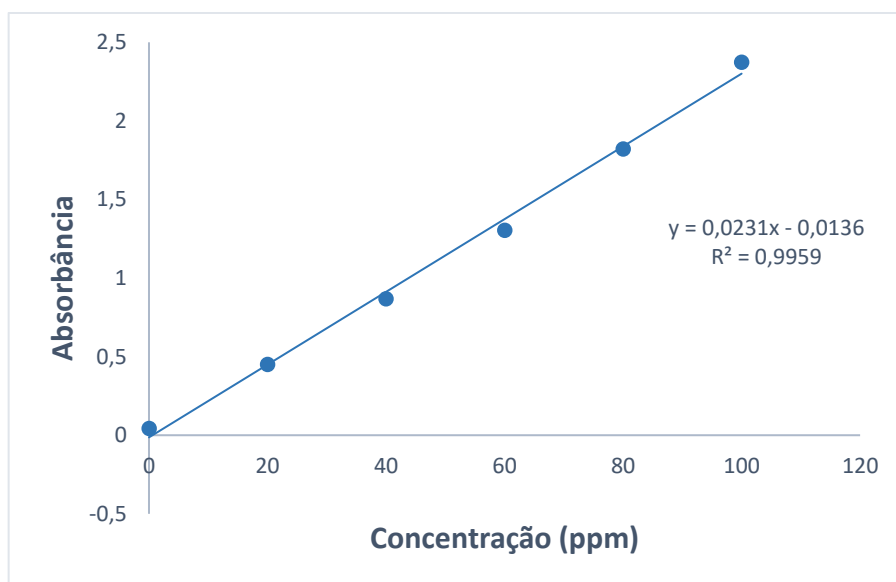
A análise do gráfico permitiu constatar que o valor de IC_{50} foi de 17,290 ppm para o chá a granel, 8,600 ppm para o chá em sachê e para o padrão ácido ascórbico foi de 5,881 ppm. Isto mostra que a atividade antioxidante do sachê pelo método do radical $ABTS^+$ foi maior para o chá verde em sachê, como também foi observado no método do radical DPPH. Este resultado se assemelha aos obtidos por Firmino *et al.* (2015), onde foram estudadas diversas marcas de chá verde a granel e em sachê, realizando a infusão aquosa com e sem agitação, e todas as marcas de sachê apresentaram percentual de inibição do radical DPPH maior que as amostras de granel.

Também podemos observar que o valor de IC_{50} do ácido ascórbico ficou próxima ao valor do sachê, indicando que o extrato obtido é um potencial antioxidante.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (III)

A atividade antioxidante avaliada por esse método é medida pela capacidade dos extratos de reduzirem o íon Fe^{3+} para Fe^{2+} pela transferência de elétrons. Assim, quanto maior a quantidade de Fe^{2+} presente, maior será a atividade antioxidante. A curva de calibração obtida para ácido ascórbico, padrão utilizado nesse teste, está apresentada na Figura 18.

Figura 18- Curva de calibração ácido ascórbico para avaliar o poder redutor do Fe (III).



Fonte: A Autora

As absorbâncias exibidas pelas amostras dos extratos obtidos a partir do chá verde em sachê e a granel, foram inseridas na equação da reta obtida. Verificou-se

que a concentração de amostra a granel foi de 391,17 mg de ácido ascórbico/g de amostra. Já para a amostra em sachê, a concentração foi de 632,94 mg de ácido ascórbico/g de amostra. O aumento da absorvância é diretamente proporcional à concentração da amostra, pois quanto maior a absorvância maior é a quantidade de Fe^{2+} formado, passando da coloração amarela para alaranjada.

Estes dados podem ser comparados aos outros métodos utilizados para determinação da atividade antioxidante utilizados neste trabalho. Concluiu-se que as amostras apresentaram o mesmo comportamento em metodologias que empregam a transferência de elétrons, quanto as que realizam a doação de hidrogênio radicalar.

5.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR REDUÇÃO DO MTT

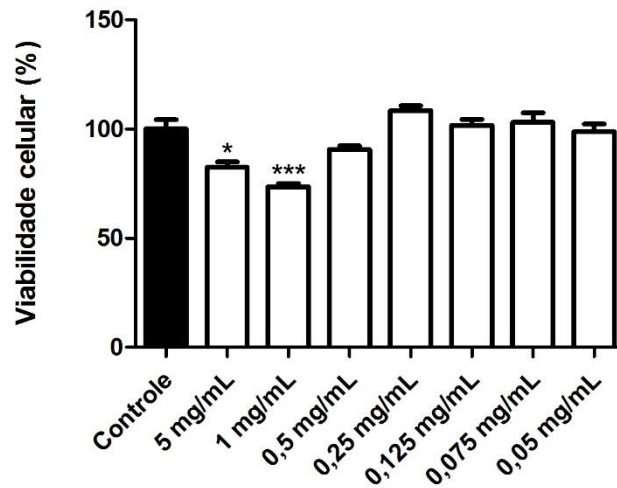
A citotoxicidade do extrato de chá verde em sachê foi avaliada a partir do teste de viabilidade celular de fibroblastos de linhagem 3T3, por meio de ensaios com MTT em 24 e 48 horas, apresentadas nas Figuras 19 e 20.

Para ambos os tempos, foi possível observar uma diminuição na viabilidade celular nas concentrações de 5 e 1 mg/mL de extrato. Na concentração de 5 mg/mL obtivemos 82,42% de viabilidade celular em 24 horas e 56,76% em 48 horas e para a concentração de 1 mg/mL a viabilidade foi de 73,62% em 24 horas e 68,25% em 48 horas, comparando com as células que receberam apenas o controle (meio DMEM) que foram padronizadas como 100% de viabilidade celular. Para as outras concentrações testadas não obteve-se diferença significativa ($P < 0,001$) de viabilidade celular entre as concentrações de extrato testadas e o controle.

Em um estudo comparativo, foram realizados testes de viabilidade celular em células tumorais de carcinoma SCC, e fibroblastos L929 (KHOZAYMEH *et al.*, 2017). Mostrando que o extrato de chá verde aquoso inibiu o crescimento de células tumorais e normais, a citotoxicidade em células tumorais com concentração de extrato de mais de 20%, foi maior do que em células normais e abaixo disso foi semelhante. Outro estudo, o extrato aquoso de chá verde foi testado em células de carcinoma de três linhagens, CAL-27, SCC-25 e KB (LIU *et al.*, 2011), para todos o chá verde foi efetivo na inibição do crescimento destes tumores, em concentrações acima de 35,0, 62,5 e 72,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Korkmaz *et al.* (2019) Relatam um estudo realizado utilizando as células tumorais PC-3 e normais 3T3, que foi a mesma linhagem utilizada neste estudo, obtendo citotoxicidade maior para as células tumorais em concentrações acima de 3,73 mg/mL, e em células normais alterou a viabilidade

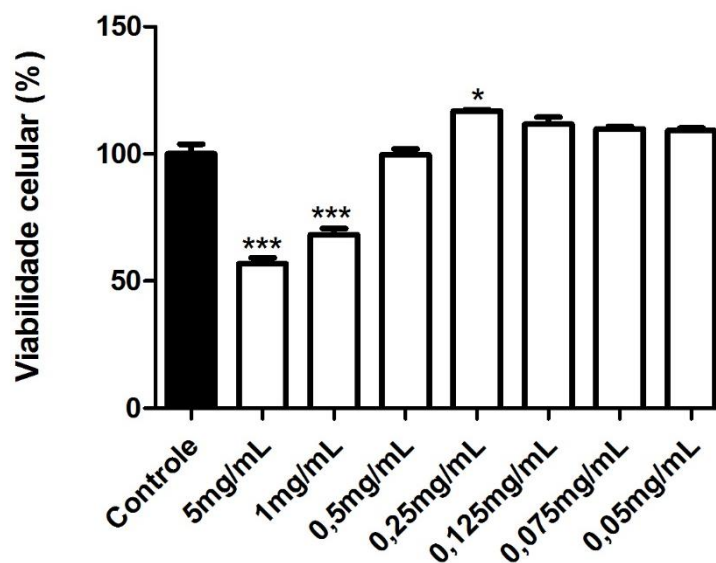
celular em concentrações acima de 5,43 mg/mL, como visto no presente estudo, os testes foram feitos apenas no tempo de 48 horas de incubação.

Figura 19- Efeito do extrato de chá verde em sachê sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 horas, pelo método do MTT. As concentrações testadas estão em mg/mL, e a análise estatística utilizada foi o teste post-hoc de Tukey. ***P<0,001 comparado ao grupo controle.



Fonte: A Autora.

Figura 20- Efeito do extrato de chá verde em sachê sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 48 horas, pelo método do MTT. As concentrações testadas estão em mg/mL, e a análise estatística utilizada foi o teste post-hoc de Tukey. ***P<0,001 comparado ao grupo controle.



Fonte: A Autora.

5.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CHÁ VERDE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massa do extrato de chá verde em sachê e a granel foram obtidos nos modos positivo e negativo, apresentando melhor resposta no modo negativo. No total foi possível identificar quinze compostos no modo negativo e alguns se repetiram no modo positivo. Os metabólitos identificados em todas as amostras de chá estão descritos na Tabela 03.

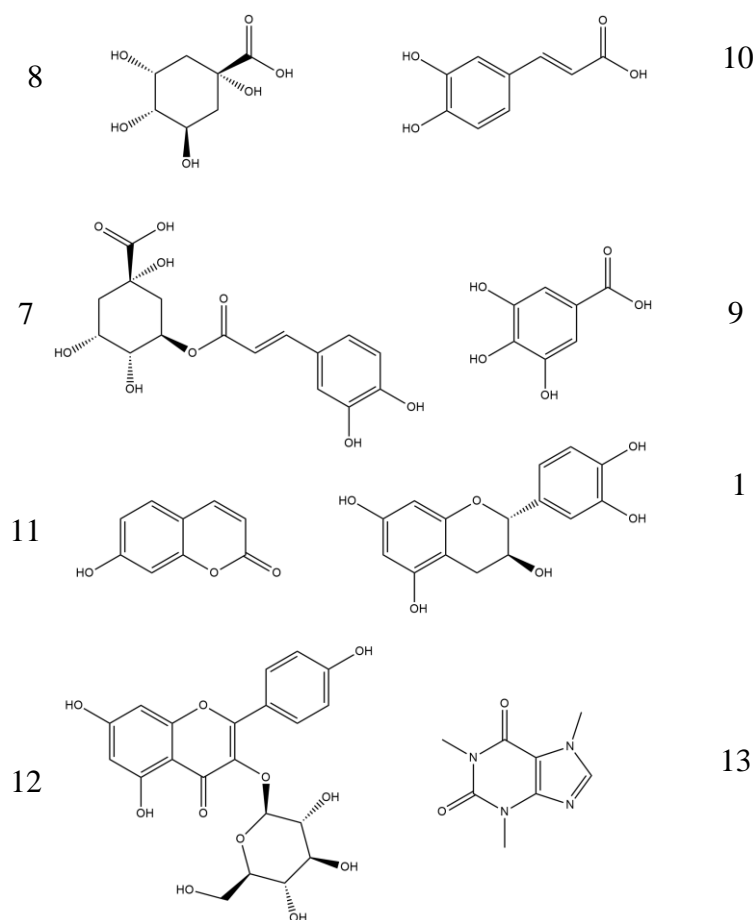
Tabela 3- Compostos encontrados nas amostras de chá verde a granel e em sachê, seus íons negativos, fragmentos observados e energia de colisão utilizada.

Número	Composto	Íon m/z	Precursor m/z	Fragmentos m/z	Energia de colisão	Granel	Sachê
1	(+)-catequina	289,32	[M-H] ⁻	271,43 / 245,21	20	+	+
2	(-)-epicatequina	289,32	[M-H] ⁻	271,43 / 245,22	20	+	+
3	(-)-epicatequina galato	441,22	[M-H] ⁻	169,19/289,18/ 270,98/331,47	18		+
4	(-)-epigallocatequina	305,29	[M-H] ⁻	179,3/ 219,23/ 125,22	17		+
5	(-)-epigallocatequina galato	457,21	[M-H] ⁻	331,07/ 305,14/ 169,2	17		+
6	Quercitina-3-β-D-glucosídeo	463,16	[M-H] ⁻	300,24	20		+
7	Ácido clorogênico	353,28	[M-H] ⁻	191,33/ 179,34	12	+	+
8	Ácido quínico	191,35	[M-H] ⁻	85,38	25	+	
9	Ácido gálico	169,34	[M-H] ⁻	125,3	15	+	+
10	Ácido cafeico	179,34	[M-H] ⁻	135,32	20	+	
11	Umbeliferona	161,36	[M-H] ⁻	133,28	20	+	
12	Astragalina	447,29	[M-H] ⁻	284,21	19	+	
13	Cafeína	195,18	[M-H] ⁻	151,11/ 123,30	20	+	
14	Saponarina	593,22	[M-H] ⁻	422,97	15		+
15	Rutina	609,14	[M-H] ⁻	301,2/ 401,15	18		+

Fonte: A Autora.

Os principais compostos identificados na amostra de chá a granel, levando em consideração a intensidade do pico no espectro de massas, foram o ácido quínico (8) e ácido cafeico (10) (Figuras 21 e 22). Outros compostos foram observados com intensidade menor como o ácido clorogênico (7), ácido gálico (9), umbeliferona (11), astragalina (12), cafeína (13), (+)-catequina (1) e (-)-epicatequina (2) (Figuras 21 e 22).

Figura 21- Compostos presentes no extrato de chá verde a granel

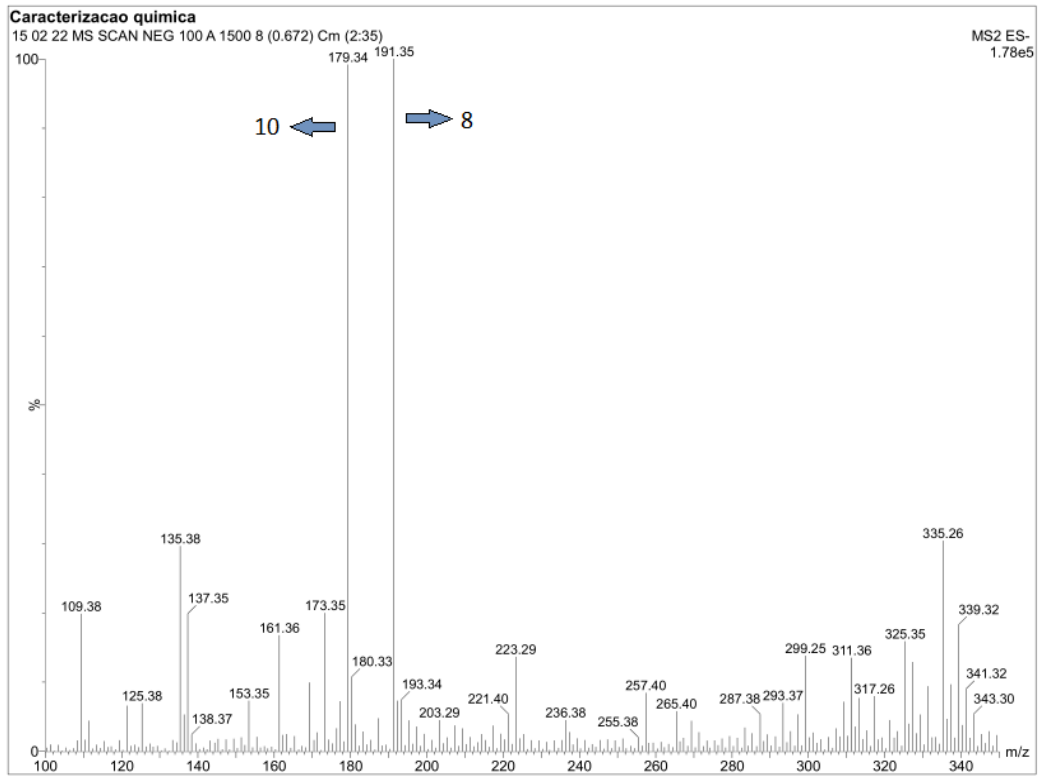


Fonte: A Autora

Para a amostra de chá em sachê, os principais compostos encontrados foram catequinas (1 à 5) (Figura 7), ácido gálico (9) e o ácido clorogênico (7) (Figuras 21 e 23). Outros metabólitos foram encontrados em menores intensidades, como umbeliferona e cafeína (Figura 23). Com isso, é possível constatar a diferença de composição química entre os chás.

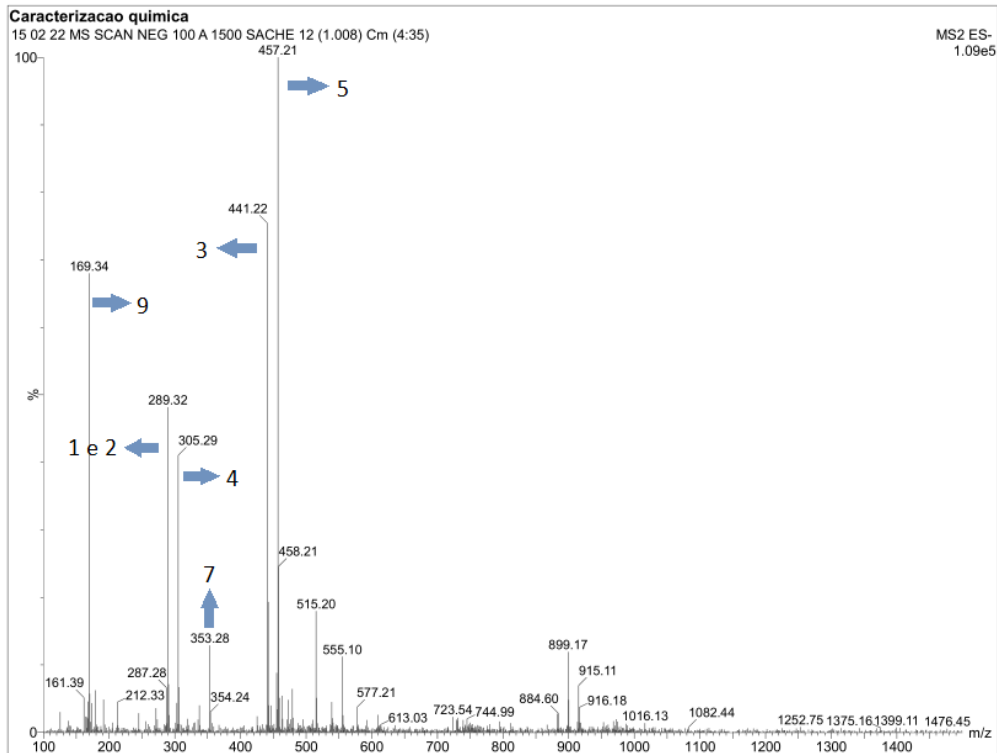
O perfil observado revelou que a quantidade de fenólicos em ambas as amostras é igual, contudo, as amostras são qualitativamente distintas. No extrato de chá em sachê, foi possível identificar maior quantidade de catequinas, ao passo que no extrato de granel houve maior quantidade de ácidos fenólicos. Isso explica o maior teor de flavonoides e maior atividade antioxidante na amostra de extrato de sachê.

Figura 22- Espectro de massas da amostra de chá verde a granel.



Fonte: A Autora

Figura 23- Espectro de massas da amostra de chá verde em sachê



Fonte: A Autora

Este tipo de análise é de extrema importância para identificação de compostos orgânicos em amostras onde se tem quantidades pequenas, podendo ser utilizado para o controle de qualidade de produtos. Se a análise for realizada com uma técnica hifenada, por exemplo acoplado a um cromatógrafo ou espectrômetro de RMN, pode ainda ser feita a quantificação dos compostos presentes na amostra.

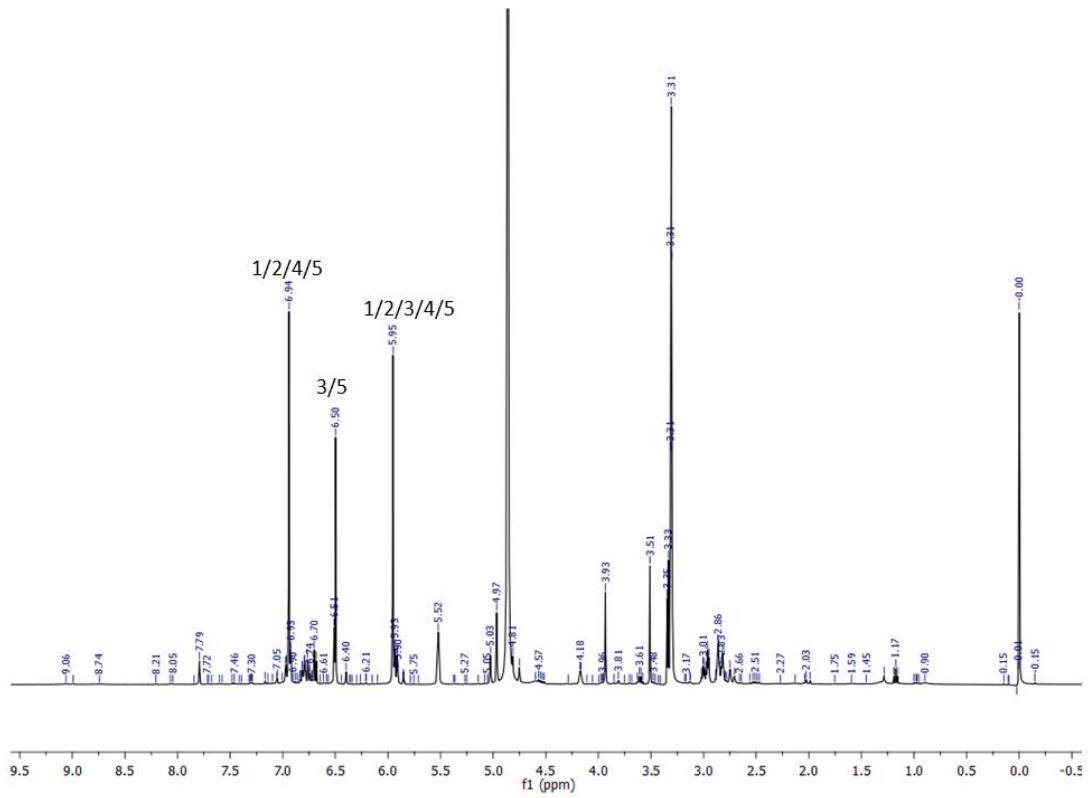
5.8 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Na Tabela 04 são descritas as atribuições de sinais de hidrogênios encontrados no espectro de RMN de ^1H (Figura 24) do extrato de chá verde em sachê. Os compostos detectados foram os principais encontrados na análise por espectrometria de massas. Os espectros de RMN de ^1H destes compostos (Figura 25) detectados foram simulados no Software MestReNova 64x e os sinais encontrados foram atribuídos no espectro obtido do extrato de sachê.

Tabela 4- Sinais obtidos teoricamente e experimentalmente para o espectro de RMN de ^1H em metanol- d_4 de extrato de chá verde em sachê.

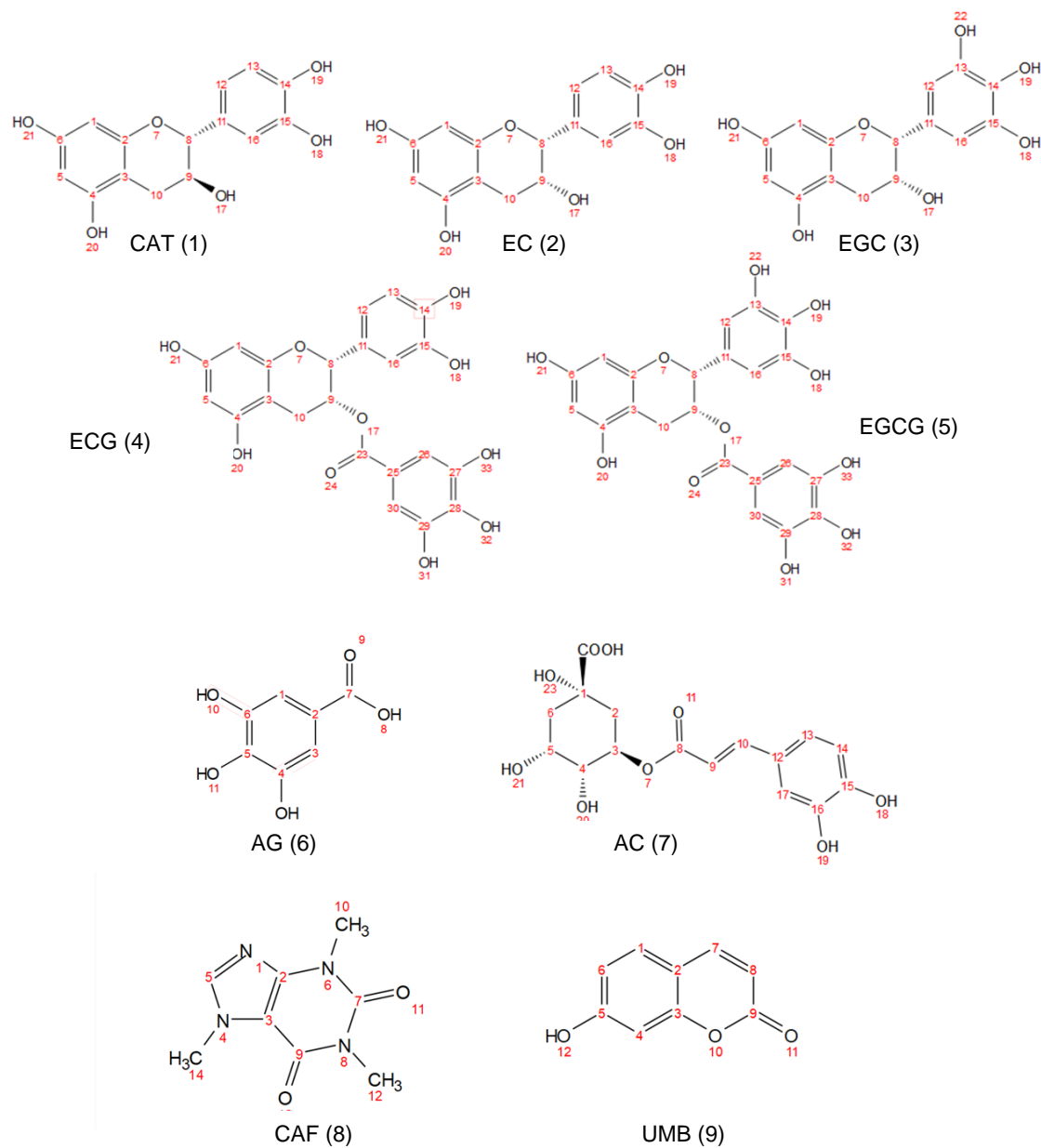
<i>Número</i>	<i>Analito</i>	<i>Sinais teóricos</i>	<i>Sinais experimentais</i>
1	CAT	2,52; 2,71; 3,91; 4,63; 5,92; 5,94; 6,77; 6,83; 6,93	2,50; 2,71; 3,97; 4,54; 5,92; 5,95; 6,75; 6,82; 6,93
2	EC	2,69; 2,81; 3,92; 4,63; 5,92; 5,96; 6,75; 6,83; 6,94	2,65; 2,79; 3,97; 4,54; 5,92; 5,95; 6,75; 6,82; 6,93
3	EGC	2,69; 2,81; 4,17; 5,92; 5,96; 6,53	2,65; 2,79; 4,18; 5,92; 5,95; 6,50
4	ECG	2,84; 3,00; 5,33; 5,48; 5,93; 5,96; 6,68; 6,75; 6,87	2,96; 3,00; 5,27; 5,38; 5,92; 5,95; 6,69; 6,74; 6,88; 6,94
5	EGCG	2,84; 3,00; 4,98; 5,93; 5,94; 6,50; 7,01	2,96; 3,00; 5,07; 5,92; 5,95; 6,50; 6,94
6	AG	6,93	6,94
7	AC	7,07; 7,55	7,15; 7,47
8	CAF	3,37; 3,43; 3,87; 7,98	3,33; 3,51; 3,93; 7,79
9	UMB	6,23; 6,74; 6,82; 7,33; 7,62	6,26; 6,64; 6,83; 7,30; 7,72

Fonte: A Autora.

Figura 24- Espectro de RMN de ^1H total do extrato de sachê de chá verde em CD_3OD 

Fonte: A Autora.

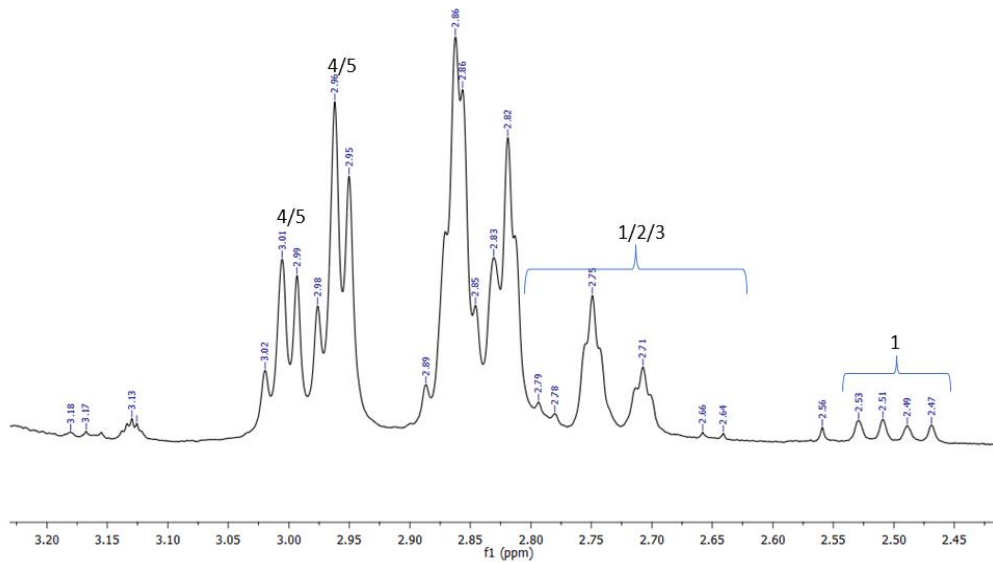
Figura 25- Estruturas de compostos identificados no espectro de RMN de ^1H do extrato de chá verde (sachê).



Fonte: A Autora

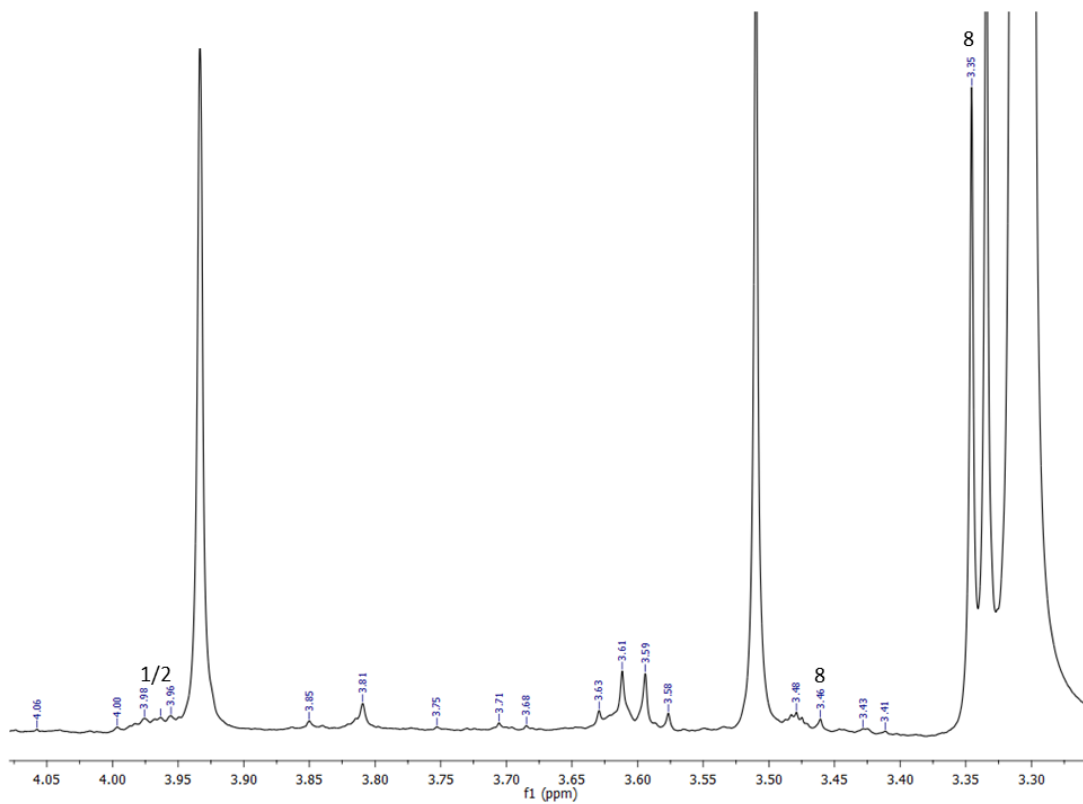
As Figuras 26, 27, 28, 29 e 30 apresentam as ampliações feitas do espectro de RMN de ^1H apresentado na Figura 24, para atribuição dos sinais que estão presentes na Tabela 04, de acordo com a numeração dos átomos mostrada na Figura 25.

Figura 26- Espectro de RMN de ^1H em metanol- d_4 do extrato de chá verde em sachê com expansão de 2,45 até 3,00 ppm



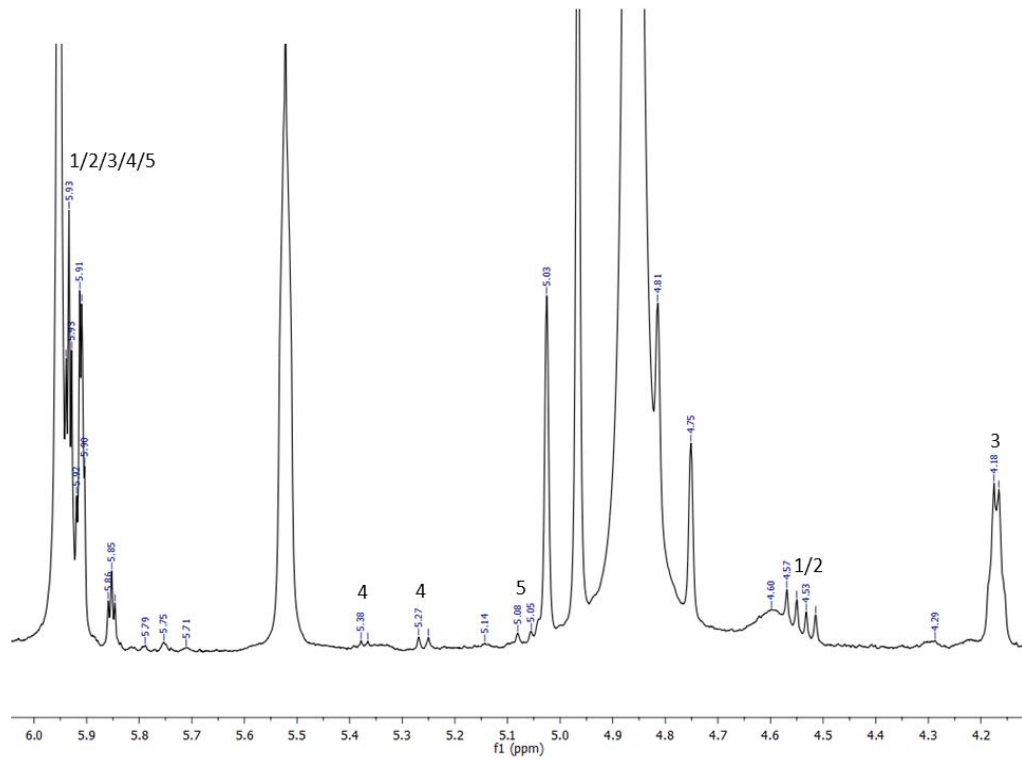
Fonte: A Autora

Figura 27- Espectro de RMN de ^1H em metanol- d_4 do extrato de chá verde em sachê com expansão de 3,20 até 4,07 ppm.



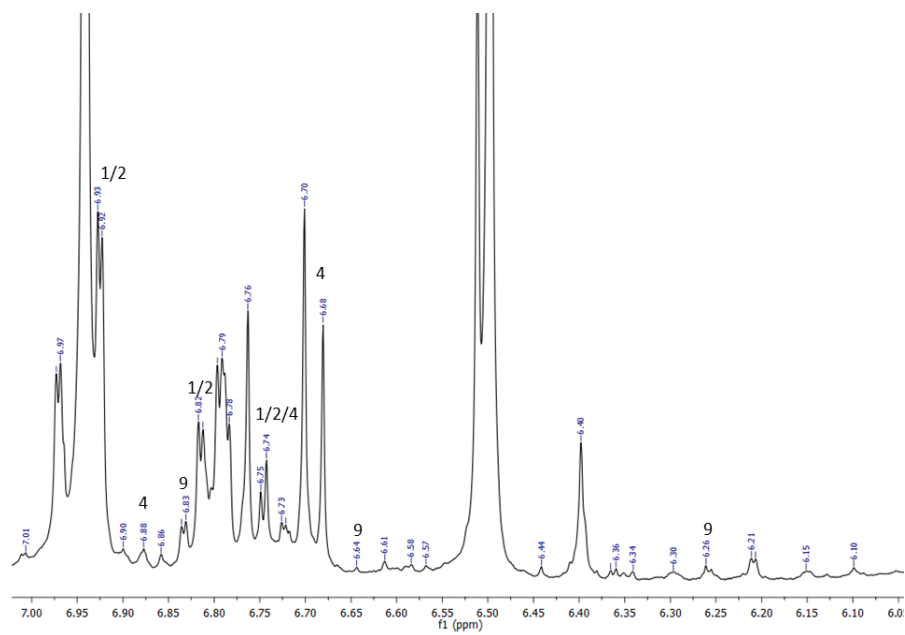
Fonte: A Autora

Figura 28- Espectro de RMN de ^1H em metanol- d_4 do extrato de chá verde em sachê com expansão de 4,15 até 6,00 ppm.



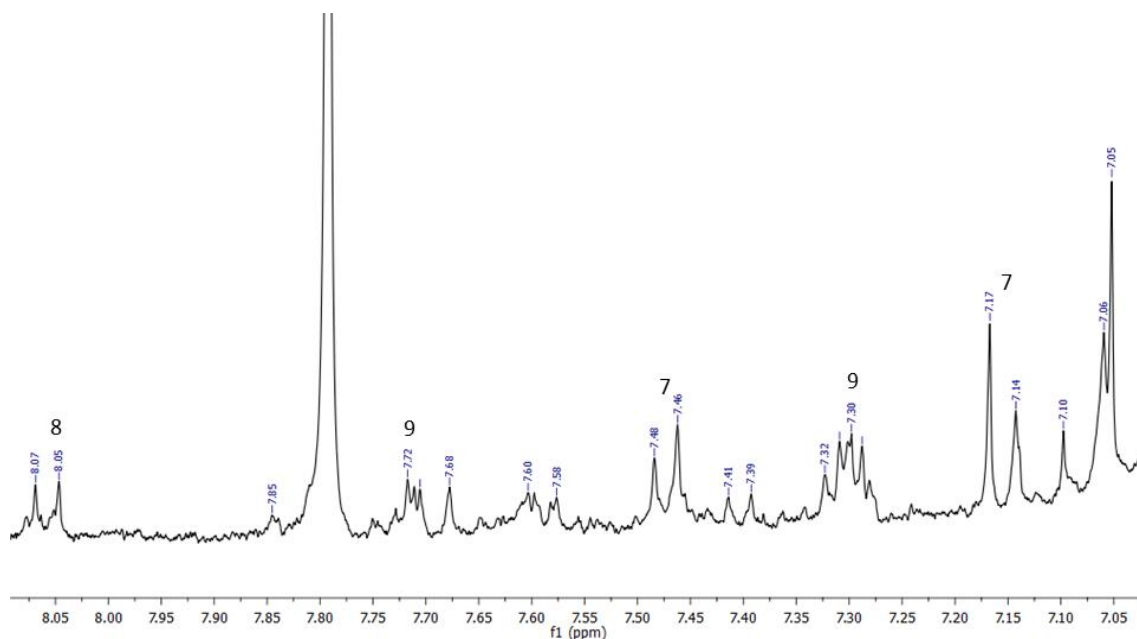
Fonte: A Autora

Figura 29- Espectro de RMN de ^1H em metanol- d_4 do extrato de chá verde em sachê com expansão de 6,05 até 7,00 ppm.



Fonte: A Autora

Figura 30- Espectro de RMN de ^1H em metanol- d_4 do extrato de chá verde em sachê com expansão de 7,05 até 8,07 ppm.



Fonte: A Autora

Os sinais obtidos no espectro do extrato para CAT foram os multipletos em 2,50 e 2,71 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono 10. O multipletos em 3,97 ppm foi atribuído, ao hidrogênio do carbono carbinólico 9, e o dupletos em 4,54 ppm, é referente ao hidrogênio do carbono 8. Foram observados, ainda, sinais em 5,92 e 5,95 ppm referentes aos hidrogênios ligados a átomos de carbono de anel aromático (C-1 e C-5), respectivamente. Os sinais relativos aos átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono de anel aromático (C-12, C-13 e C-16) foram observados em 6,82 ppm, 6,75 ppm e 6,93 ppm, respectivamente.

Para o epímero da catequina, EC, foram observados no espectro de RMN de ^1H nove sinais de hidrogênio, sendo eles o sinal em 2,65 e 2,79 ppm (Figura 26) para os hidrogênios ligados ao carbono 10, a diferença de orientação espacial de CAT para EC, faz com que estes hidrogênios de C-10 tenham maior deslocamento químico do que em CAT. Observou-se um multipletos em 3,97 ppm, referente ao hidrogênio do carbono 9 (Figura 27) um dupletos em 4,54 ppm (Figura 28) que pertence ao hidrogênio do carbono metínico 8. Foram observados também os sinais relativos para os hidrogênios ligados aos átomos de carbono sp^2 de anel aromático, com deslocamento químico de 5,92, 5,95, 6,82, 6,75 e 6,93 ppm, atribuídos a C-5, C-12, C-13 e C-16, respectivamente, relativos a uma catequina.

No espectro de RMN de ^1H de EGC, foram observados dois dupletos em 2,65 e 2,79 ppm sinais referentes aos átomos de hidrogênio ligados a C-10 (Figura 26). Os sinais observados em 5,92 ppm e 5,95 ppm (Figura 28), foram atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono constituintes de anel aromático C-1 e C-5. O simpleto observado em 6,50 ppm foi atribuído aos átomos de hidrogênio de carbonos equivalentes C-12 e C-16 mostrado na Figura 24, este sinal mostra a principal diferença entre EC e EGC, pois o anel aromático B sendo semelhante, os sinais de C-12 e C-16 são equivalentes, diferentemente dos sinais de hidrogênio no anel aromático B de EC, que são atribuídos separadamente com maior deslocamento químico.

A presença de ECG foi constatada a partir da observação de dez sinais no espectro de RMN de ^1H . Os sinais nos deslocamentos químicos de 2,96 e 3,00 ppm foram associados aos átomos de hidrogênio ligados a C-10 (Figura 26). O multipletto em 5,38 ppm foi atribuído ao hidrogênio do carbono carbinólico C-9, e um dupletto em 5,27 ppm pertencente ao hidrogênio metínico de C-8, sendo esses os sinais característicos de um esqueleto do tipo epigalocatequina, estes sinais de hidrogênios de C-8, C-9 e C-10, são característicos para identificar a ECG, pois há um aumento no valor do deslocamento químico com a presença do grupo galato, comparando com a EC. Foram observados também, ambos mostrados na Figura 28, os hidrogênios aromáticos 1 e 5 com deslocamento químico de 5,92 e 5,95 ppm, e para os hidrogênios dos carbonos 12, 13 e 16, 6,69 ppm, 6,74 ppm e 6,88 ppm, respectivamente (Figura 29), e um simpleto em 6,94 ppm referente aos hidrogênios dos carbonos 26 e 30 do aromático proveniente do ácido gálico, mostrado na Figura 24.

Os sinais característicos de EGCG foram aqueles atribuídos aos hidrogênios do carbono 10, em 2,96 e 3,00 ppm (Figura 26), estes sinais estão mais desblindados nas estruturas dos galatatos (ECG e EGCG) do que nas catequinas (EC e EGC). O hidrogênio do carbono 8 apresenta o sinal de dupletto em 5,07 ppm (Figura 28), este sinal indica a principal diferença entre ECG e EGCG, devido a presença de uma hidroxila a mais no anel aromático B. Os sinais de deslocamento químico em 5,92 e 5,95 ppm são característico dos hidrogênios 1 e 5 do anel aromático, todas as catequinas apresentaram estes sinais (Figura 28). Para os hidrogênios equivalente dos carbonos 12 e 16 foi atribuído o simpleto em 6,50 ppm (Figura 24), também evidenciando a presença deste composto, uma vez que em ECG os sinais são

diferentes para os hidrogênios de C-12, C-13 e C-16 do anel aromático B. Para os hidrogênios do anel aromático derivado do ácido gálico o simpleto em 6,94 ppm é igual a ECG (Figura 24).

Além das catequinas, foram identificados sinais característicos do ácido gálico, ácido clorogênico, cafeína e umbeliferona (Figura 25). Para o ácido gálico observa-se no espectro o simpleto em 6,94 ppm (Figura 24) referente aos hidrogênios equivalentes dos carbonos 1 e 3 do anel aromático.

O ácido clorogênico apresentou sinais característicos da insaturação α , β à carbonila do composto, que foram observados em 7,15 e 7,47 ppm, respectivamente (Figura 30).

Foi possível constatar a presença de cafeína devido à presença de três simpletos em 3,33; 3,51 e 3,93 ppm dos grupos *N*-metil nas posições dos carbonos 10; 12 e 14, e em 7,79 ppm um simpleto (Figura 30) do hidrogênio do carbono 5.

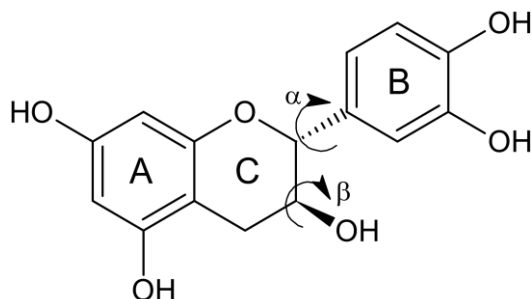
A umbeliferona apresentou cinco sinais, sendo eles em 7,72 e 6,26 ppm referentes aos hidrogênios vinílicos dos carbonos 7 e 8, respectivamente (Figura 30 e 29). Os sinais dos hidrogênios aromáticos dos carbonos 1, 4 e 6 estão em 7,30, 6,64 e 6,83 ppm, respectivamente (Figura 30 e 29).

Com esta análise detalhada, pode-se afirmar que os resultados obtidos a partir dos espectros de RMN corroboram com os dados observados pela Espectrometria de massas.

5.9 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

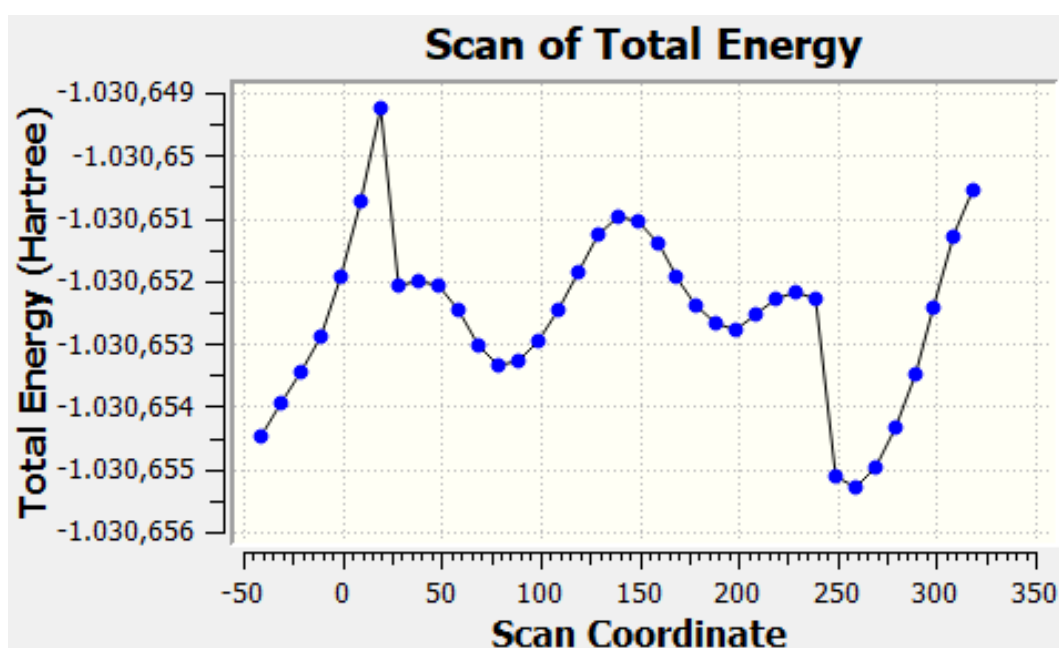
A análise conformacional da (+)-catequina traz dados sobre a conformação mais estável no equilíbrio e quais são os efeitos estabilizantes desses conformeros. Dessa forma, é possível correlacionar esses resultados com dados experimentais e prever potenciais atividades biológicas para o composto. Primeiramente, foram feitos cálculos de *scan* rotacionando o ângulo diedro α em 36 passos (Figura 31). A estrutura foi desenhada com o pacote de visualização molecular GaussView 6.0.16 com o anel B e o grupo hidroxila na posição equatorial, pois segundo o estudo realizado por HAYASHI e UJIHARA (2016) esta conformação possui menor energia. Obteve-se assim, o gráfico de coordenadas *versus* energia potencial da conformação (Figura 32).

Figura 31- Estrutura da (+)-catequina com ênfase nos ângulos diedros α e β .



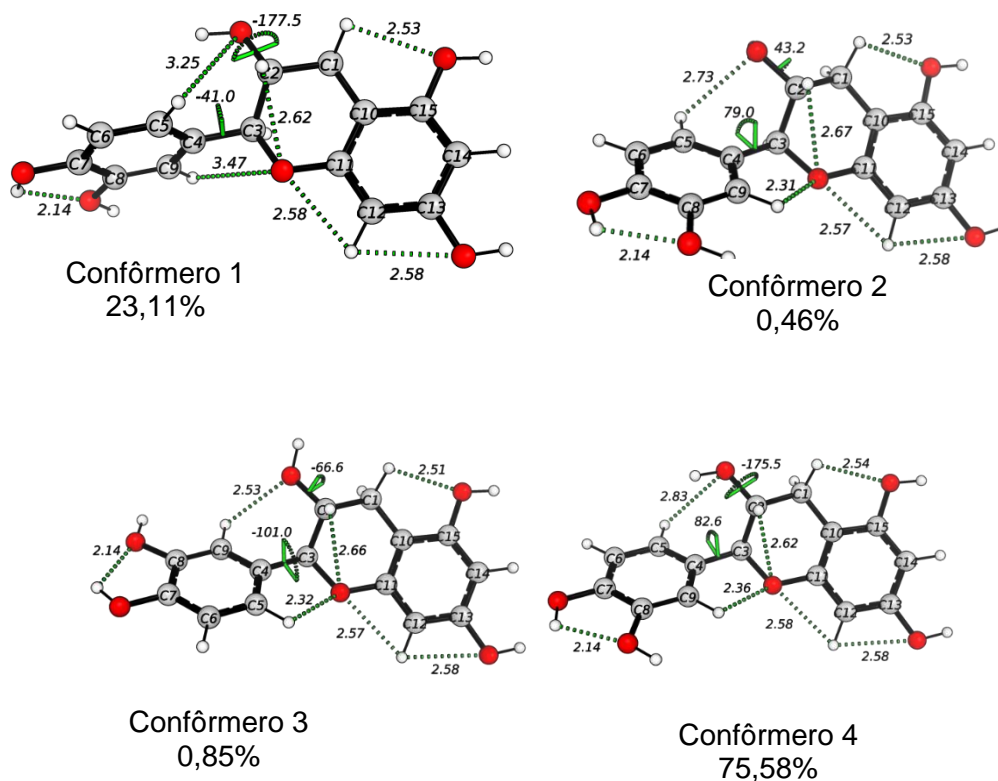
Fonte: A Autora.

Figura 32- Gráfico de *scan* obtido com o giro do ângulo diedro α da (+)-catequina.



Os pontos de menor energia são chamados de pontos de mínimo. Os mesmos foram selecionados e, para cada conformação obtida, foi realizado o giro do diedro β (Figura 31). A partir dos confôrmeros obtidos, foram feitos cálculos de otimização e frequência, para confirmar quais são as geometrias mais estáveis da (+)-catequina, ao final foram obtidos quatro confôrmeros de menor energia (Figura 33).

Figura 33- Conformações mais estáveis da (+)-catequina e suas populações.



Fonte: A Autora

No estudo de Anitha e colaboradores (2020) foram realizados cálculos para encontrar o melhor sítio ativo de doação de próton para a atividade antioxidante da (+)-catequina, e foi possível observar que a hidroxila de C7 faz ligação de hidrogênio intramolecular com a hidroxila de C8. Essa interação é importante para definir que 7-OH é o melhor sítio ativo, pois é onde o radical ataca preferencialmente.

Os confômeros mais estáveis são o 1 e o 4, que possuem populações de 23,11% e 75,58%, respectivamente. Ambas apresentam o hidrogênio da hidroxila do ângulo diedro β voltada para o anel aromático B, enquanto as conformações com menor população apresentam o hidrogênio para outra direção. Os ângulos diedros obtidos nas quatro conformações mais estáveis e suas energias relativas estão apresentadas na Tabela 05.

Tabela 5- Energias relativas em kcal/mol e ângulos diedros dos confôrmeros da (+)-catequina.

	ΔE (kcal/mol)	Ângulo α	Ângulo β
Confôrmero 1	0,70	92,44	4,25
Confôrmero 2	3,03	102,43	54,17
Confôrmero 3	2,66	85,11	125,94
Confôrmero 4	0,00	93,58	0,03

Fonte: A Autora

Analisando os valores de energia, foi possível concluir que os confôrmeros 1 e 4 são os mais estáveis. Visando explicar estes resultados, foram realizados cálculos de NBO, que demonstram os efeitos hiperconjugativos da molécula, eles estão apresentados na Tabela 06:

Tabela 6- Principais interações hiperconjugativas da (+)-catequina e suas energias de estabilização em kcal/mol.

	Confôrmero 1	Confôrmero 2	Confôrmero 3	Confôrmero 4
Anel Aromático A	220,11	195,89	220,18	220,09
Anel Aromático B	214,35	212,88	215,32	211,79
Par de elétrons O16	35,66	36,5	36,83	34,62
Par de elétrons O17	8,96	13,95	8,4	9,29
Par de elétrons O18	37,18	36,01	36,07	36,63
Par de elétrons O19	34,01	33,07	32,98	33,95
Par de elétrons O20	37,06	37,48	37,36	37,2
Par de elétrons O21	38,18	38,27	37,97	38,41
Anel Aromático A- com-Oxigênio do ciclo C	8,44	8,5	8,5	8,47
SOMA	633,95	612,55	633,61	630,45

Fonte: A Autora

As energias de estabilização analisadas foram dos anéis aromáticos A e B, dos pares de elétrons dos oxigênios da molécula e da interação entre o anel aromático A com o oxigênio do ciclo C. Os valores do somatório de energias encontrados foram próximos, não sendo possível diferenciar qual confôrmero seria o mais estável, como foi visto nos cálculos de otimização e frequência. Constatou-se que a diferença de ângulo α não impactou na contribuição energética do anel aromático B para estabilização da molécula.

A partir deste estudo não foi possível obter explicações sobre a maior estabilidade do confômero 4. Porém, analisando as estruturas de menor energia obtidas, podemos observar que o anel aromático B apresenta uma conformação espacial menos planar em relação ao restante da estrutura nos confômeros 1 e 4, contribuindo para a diminuição do efeito estérico que deve ser maior nos confômeros 2 e 3. Para confirmar esta hipótese, podem ser realizados cálculos computacionais que avaliem o efeito estérico em cada conformação obtida.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a técnica de extração dos compostos fenólicos do chá verde a partir do ultrassom foi efetiva. A extração dos flavonoides utilizando acetato de etila foi eficaz e levou a rendimento similar (cerca de 4%) para ambas as amostras. Na avaliação de composição, o teor de compostos fenólicos nas amostras foi semelhante, mas o teor de flavonoides no extrato do chá em sachê foi maior que do chá a granel. Com isto foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos, e para o extrato de sachê obteve-se maior efeito antioxidante que para a amostra em granel, independentemente do método avaliado. Com o teste de viabilidade celular observamos que abaixo da concentração de 1mg/mL o extrato não apresentou efeito citotóxico para células normais. A partir da espectrometria de massas observamos diferenças na composição do chá verde de sachê e a granel. Essa diferença de atividade antioxidante dos extratos pode estar relacionada a maior presença de catequinas no extrato de sachê, para complementar com a espectroscopia de RMN de ^1H pode-se analisar os sinais dos principais compostos encontrados no extrato de sachê após análise da espectroscopia de massas. A análise conformacional permitiu observar quais são os confôrmeros de maior estabilidade da (+)-catequina.

REFERÊNCIAS

- ANITHA, S. Theoretical investigation on the structure and antioxidant activity of (+) catechin and (-)epicatechin – a comparative study. **Molecular Physics**, p. 1-12, 2021.
- AVALOS, A. G.; PÉREZ, E. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, p. 119-145, 2009.
- AZEVEDO, J. P. **Análise cromatográfica e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC.** Universidade Estadual Paulista. Araraquara, p. 34. 2016.
- BARRET, A. Salicylic Acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** , v. 31, n. 101884, p. 1878-8181, 2021.
- CAMARGO, L. E. A.; PEDROSO, L. S.; VENDRAME, S.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 76, n. 2, p. 428-434, 2016.
- CAZAL, M. D. M. **Efeito da ingestão de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) antes do exercício aeróbico sobre indicadores metabólicos, de dano muscular e estresse oxidativo.** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/ MG, p. 85. 2019.
- CHLOPICKA, J.; PASKO, P.; GORINSTEIN, S.; JEDRYAS, A.; ZAGRODZKI, P. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 548- 555, 2012.
- CHRISTODOULEAS, D. C. Evaluation of total reducing power of edible oils. **Talanta**, v. 130, p. 233- 240, 2014.
- DA SILVA, J. D.; GOMES, M. V.; CABRAL, L. M.; DE SOUSA, V. P. Evaluation of the *in vitro* release and permeation of *Cordia verbenacea* DC essential oil from topical dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p. 101173, 2019.

DA SILVA, L. R.; MARTINS, L. V.; BANTIM, I. F. C.; MEIRELES DE DEUS, M. S.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

DAS, P. R.; EUN, J. B. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. **Food Chemistry**, v. 253, p. 22- 29, 2018.

DAS, P. R.; EUN, J. B. Profiling of volatile and non-phenolic metabolites—Amino acids, organic acids, and sugars of green tea extracts obtained by different extraction techniques. **Food Chemistry**, v. 296, p. 69- 77, 2019.

DAS, P. R.; ISLAM, T.; LEE, S. H.; LEE, M. K.; KIM, J. B.; EUN, J. B. UPLC-DAD-QToF/MS analysis of green tea phenolic metabolites in their free, esterified, glycosylated, and cell wall-bound forms by ultra-sonication, agitation, and conventional extraction techniques. **LWT - Food Science and Technology**, v. 127, p. 109440, 2020.

DINIZ, P. H. G. D. Novas estratégias para classificação simultânea do tipo e origem geográfica de chás. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 12. 2013.

FARIAS, S. A. S.; COSTA, K. S.; MARTINS, J. B. L. Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-ol. **ACS Ômega**, p.1-11, 2021.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, p. 120- 130, 2017.

FIRMINO, L. A.; MIRANDA, M. P. S. Polifenóis totais e flavonoides em amostras de chá verde (*Camellia sinensis* L.) de diferentes marcas comercializadas na cidade de Salvador-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 436- 443, 2015.

HAYASHI, N.; UJIHARA, T. Conformations of Flavan-3-ols in Water: Analysis Using Density Functional Theory. **Journal of natural products**, p.1-9, 2016.

JAISWAL, A. K. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetable. **Academic Press**, 2020.

KHOZAYMEH, F. et al. Growth inhibition and cytotoxicity effect of green tea extract on squamous cell carcinoma cell line: an *in vitro* study. **Annals of Dental Specialty**, v.5, p. 89-92, 2017.

KODAMA, D. H.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, M. F.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** , v. 30, n. 4, p. 1077-1082, 2010.

KORKMAZ, N. Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. **Turkish Journal Biochemical**, p. 1-11, 2019.

KOWALSKI, R.; WYROSTEK, J.; KAŁWA, K.; KOWALSKA, G.; PANKIEWICZ, U.; SUJKA, M.; WŁODARCZYK-STASIAK, M.; MAZUREK, A. Avaliação sensorial e química de emprego de infusões de chás preparados com o ultrassom. **Ciência Rural**, v. 49, n. 11, p. e201900056, 2019.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. 1- 10, 2019.

LAMARÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 257- 269, 2009.

LIAO, S.; KAO, Y.-H.; HIIPAKKA, R. A. Green Tea: Biochemical and Biological Basis for Health Benefits. **VITAMINS AND HORMONES**, v. 62, p. 1- 94, 2001.

LIU, X. The Effect of Green Tea Extract and EGCG on the Signaling Network in Squamous Cell Carcinoma. **Nutrition and Cancer**, p.466–475, 2011.

LORDÊLO, M. C. S.; SILVA, R. C.; DOS SANTOS, A. S.; BELLO, M. G. K. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669-682, 2010.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, p. 33-39, 2008.

MAGALHÃES, B. E. A.; DOS SANTOS, W. N. L. Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões e decocções de ervas medicinais. **Produtos Naturais e Suas Aplicações: da comunidade para o laboratório**, p. 235- 274, 2021.

MAITI, S.; NAZMEEN, A.; MEDDA, N.; PATRA, R.; GHOSH, T. K. Flavonoids green tea against oxidant stress and inflammation with related human diseases. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 24, p. 1- 14, 2019.

MARCUCCI, M. C. Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenóis Totais em Própolis. **Revista Virtual de Química**, v.13, p.1-13, 2021.

MARTINY, T. R. Alternativas de extratos naturais em cosméticos: uma visão geral das oportunidades e desafios. **Revista da Jornada de Pós-graduação e Pesquisa**, v.17, p.113-122, 2021.

MIKOŁAJCZAK, N.; TANSKA, M.; OGRODOWSKA, D. Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology** , v. 113, p. 110- 138, 2021.

NELSON, A. S.; WHITEHEAD, S. R. Fruit secondary metabolites shape seed. **Trends in Ecology & Evolution**, p. 1-11, 2021.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 191- 196, 2010.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, p. 1051- 1056, 2011.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36- 44, 2015.

OLIVEIRA, P. S.; MÜLLER, R. C. S.; DANTAS, K.; ALVES, C. N.; VASCONCELOS, M. A. M.; VENTURIERI, G. C. Ácidos Fenólicos, Flavonoides e Atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, p. 1728-1732, 2012.

PEREIRA, V. P.; KNOR, F. J.; VELLOSA, J. C. R.; BELTRAME, F. L. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 490-498, 2014.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; DOS SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências Universidade de São Paulo**. São Paulo, p. 1-5. 2017.

RASHIDINEJAD, A.; BOOSTANI, A.; BABAZADEH, A.; REHMAN, A.; REZAEI, A.; AKBARI-ALAVIJEH, S.; SHADDEL, R.; JAFARI, S. M. Opportunities and challenges for the nanodelivery of green tea catechins in functional foods. **Food Research International**, v. 142, 2021.

REGINATO, F. Z.; HAAS, A. R. S.; BAUERMANN, L. F. Avaliação do uso de flavonoides no tratamento. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 49, n. 3, p. 569- 582, 2015.

ROASA, J.; DE VILLA, R.; MINE, Y.; TSAO, R. Phenolics of cereal, pulse and oilseed processing by-products and potential effects of solid-state fermentation on their bioaccessibility, bioavailability and health benefits: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 954- 974, 2021.

ROMAN, J. A.; RUEDA, J. R. S.; BRAVO, F. I.; ARAGONES, G.; SUAREZ, M.; ARNAL, A. A.; MULERO, M.; SALVADÓ, M. J.; AROLA, L.; FUENTES, C. T.; MUGUERZA, B. Phenolic compounds and biological rhythms: Who takes the lead? **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 77- 85, 2021.

ROZADA, T. C. **Análise da associação de aminoácidos e receptores de carboidratos com alguns carboidratos representativos através de RMN e cálculos teóricos**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá. 2015.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. **Embrapa**, Fortaleza, v. 128, p. 1-4, 2007

SEHGAL, R. A. An update on disease preventing potential of green tea in comparison with some tisanes. **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 92-96, 2022.

SENANAYAKE, N. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1529- 1541, 2013.

SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, p. 292- 300, 2010.

ŠILAROVÁ, P.; CESLOVÁ, L.; MELOUN, M. Fast gradient HPLC/MS separation of phenolics in green tea to monitor their degradation. **Food Chemistry**. v. 237, p. 471-480, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71- 81, 2002.

CESARIN-SOBRINHO, D.; FERREIRA, J. C. N.; BRAZ-FILHO, R. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Química Nova**, v. 24, p. 604- 611, 2001.

SORVARI, J.; HARTIKAINEN, S. Terpenes and fungal biomass in the nest mounds of *Formica aquilonia* wood ants. **European Journal of Soil Biology**, v. 105, n. 10336, p. 1-6, 2021.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 165- 181, 2012.

WU, T. et al. Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. **Plant Communications** 2, n. 100235, p. 1-12, 2021.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 27-32, 1995.

ZHANGA, J.; CHENB, J.; LIANGA, Z.; ZHAO, C. New Lignans and Their Biological Activities. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v. 11, n. 1, p. 1-54, 2014.

ZHAOMING, Y.; YINZHAO, Z.; YEHUI, D.; QINGHUA, C.; FENGNA, LI. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. **Animal Nutrition**, v. 6, p. 115- 123, 2020.

ZHONGYUAN, L.; RENTIAN, Z.; CHONGSHAN, Y.; BIN, H.; XIN, L.; YANG, L.; CHUNWANG, D. Research on moisture content detection method during green tea processing based on machine vision and near-infrared spectroscopy technology. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 271, p. 120921, 2022.