

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

POLIFENÓIS EM CHÁS COMERCIALIZADOS NO BRASIL

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Simara Matsubara** aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de julho de 2001.

Campinas, 30 de julho de 2001



Profa. Dra. Délia Rodriguez Amaya
Presidente da Banca

Simara Matsubara

Engenheira de Alimentos

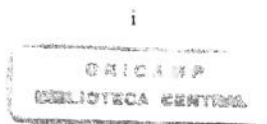
Delia B. Rodriguez-Amaya

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP

2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

650611002

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
M429p
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 46370
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 14/09/01
 N.º CPD

CM00159808-0

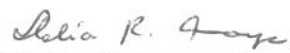
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M429p Matsubara, Simara
 Polifenóis em chás comercializados no Brasil / Simara
 Matsubara. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Delia Balin Rodriguez-Amaya
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Chá. 2. Polifenóis. 3. Flavonóides. 4. Cromatografia líquida
 de alta eficiência. 5. Análise. I. Rodriguez-Amaya, Delia Balin.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
 de Alimentos. III. Título.

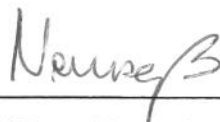
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya
(Orientadora)



Prof. Dra. Myrna Sabino



Prof. Dra. Neura Bragagnolo

Prof. Dra. Célia Maria de Sylos

INCONSTANCIA DOS BENS DO MUNDO

Nasce o Sol, e não dura mais que um dia,

Depois da Luz se segue a noite escura,

Em tristes sombras morre a formosura,

Em contínuas tristezas a alegria.

Porém, se acaba o Sol, por que nascia?

Se é tão formosa a Luz, por que não dura?

Como a beleza assim se transfigura?

Como o gosto da pena assim se fia?

Mas no Sol, e na Luz falte a firmeza,

Na formosura não se dê constância,

E na alegria sintá-se tristeza.

Começa o mundo enfim pela ignorância,

E tem qualquer dos bens por natureza

A firmeza somente na inconstância.

(Gregório de Matos Guerra)

DEDICO,
esta vitória aos meus pais,
meus primeiros educadores,
obrigada pelo carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya pela orientação, apoio, e pelas lições para o futuro.

Às professoras Dra. Célia Maria de Sylos, Dra. Myrna Sabino e Dra. Neura Bragagnolo, membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas ao trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos caros funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos, da Secretaria de Pós-Graduação, Biblioteca e aos demais funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela disposição em ajudar.

À Carla da Der Teeladen pelo fornecimento de material para o trabalho e pela atenção e interesse.

À Miyuki e demais alunos de pós do Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química pela gentileza na orientação do uso da balança analítica.

À Belzinha e à Fifa...podem ter certeza que vocês são parcialmente culpadas por este caminho que tomei.

Ao “Pessoal dos Carotenóides”, ao Renato, à Elza e à Débora, que muito compartilharam as alegrias das descobertas e as frustrações do dia-a-dia.

Ao “Pessoal da Waters”, pela atenção e disposição em sanar problemas.

À amiga-irmã mais velha Mieko, pelos puxões de orelha, mas sobretudo pelas conversas e conselhos.

Aos amigos, incondicional e indistintamente.

Aos meus irmãos, meus companheiros.

À toda a minha família, pelo carinho nas voltas para casa, nas conversas ao redor da mesa, pelas boas risadas.

A todos que de alguma maneira colaboraram para este trabalho, seja através de sugestões, ou de bons papos.

A Deus, pelo Sol que me guia todas as manhãs e pela certeza de que é preciso ter Fé.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	xi
RESUMO GERAL	xiii
 CAPÍTULO 1 – Polifenóis em chás: importância, análise e composição.	
Resumo	2
Summary	3
1 – Introdução.....	4
2 – Efeitos benéficos à saúde	4
3 – Chás e polifenóis.....	8
4 – Metodologia analítica.....	11
4.1 – Extração	12
4.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência.....	16
5 – Composição de polifenóis em chás.....	20
5.1.Catequinas.....	20
5.2.Teaflavinas.....	23
5.3.Flavonóis	24
6 – Considerações finais	26
Referências bibliográficas.....	27

CAPÍTULO 2 – Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil.

Resumo	43
1.Introdução.....	44
2.Material e métodos.....	46
2.1.Amostras	46
2.2.Padrões e reagentes	47
2.3.Preparação de amostras e hidrólise	48
2.4.Cromatografia	49
2.5.Curva padrão.....	49
3.Resultados e discussão	50
3.1.Características da curva padrão	50
3.2.Repetitividade	50
3.3.Teores de flavonóis agliconas em chás verde e preto	51
3.4.Estudo de flavonóis agliconas em outros chás comercializados no Brasil.....	54
4.Conclusão	57
Referências bibliográficas.....	58

CAPÍTULO 3 – Quantificação simultânea de catequinas, e teaflavinas em chás comercializados no Brasil.

Resumo	63
Introdução	64
Material e métodos	66

Amostras.....	66
Padrões e reagentes.....	67
Preparação das amostras.....	68
Cromatografia.....	69
Curva padrão.....	69
Resultados e discussão.....	70
Características da curva padrão.....	70
Teores de catequinas.....	71
Teores de teaflavinas.....	77
Referências bibliográficas.....	79
ANEXOS.....	84

INTRODUÇÃO GERAL

Os flavonóides, fitoquímicos bioativos, têm recebido grande destaque em trabalhos científicos de diversas áreas. Divididos em grandes grupos, como as isoflavonas, flavonas, antocianinas, flavonóis e flavanóis, os flavonóides são amplamente distribuídos na natureza, e assim, presentes em muitas fontes na dieta alimentar. O presente trabalho tem especial enfoque sobre os flavonóis e flavanóis (catequinas) e os polifenóis teaflavinas, que são produtos de condensação de catequinas e características de chá preto. O chá preto, como o verde são infusões de folhas da mesma planta, a *Camellia sinensis*, e diferem quanto ao seu processamento. Juntos, colocam o chá como a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água.

A ação benéfica à saúde, ainda em potencial, tem bons avanços em estudos *in vitro*, *in vivo* e epidemiológicos em relação à diminuição de risco de doenças degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares. No que diz respeito ao câncer, os estudos *in vitro* já possibilitaram verificar que os flavonóides podem ter ação em todas as fases de carcinogênese. Em doenças cardiovasculares, vários mecanismos também já foram estudados. Estudos em animais apóiam os estudos *in vitro*, mas os resultados dos estudos epidemiológicos são ainda inconsistentes.

Os chás verde e preto já foram analisados em termos de flavonóis, catequinas e teaflavinas. No entanto, há uma grande variação nos resultados. Uma parte desta variabilidade pode ser devido ao efeito geográfico, condições de plantio e

processamento. Mas, pela magnitude de variação, erros analíticos parecem ser também envolvidos.

No Brasil, o consumo de infusões tem contribuição maciça do chá mate, mas sua composição quanto a flavonóides não é conhecida. O mesmo ocorre com chás de ervas, flores e frutas, muito apreciados no país. Um estudo para caracterização destes produtos teria grande importância à população brasileira, inclusive para levar este item da dieta à categoria de alimento funcional, a exemplo dos chás verde e preto.

O presente trabalho teve como objetivos: (a) quantificar flavonóis em chás comercializados no Brasil; e (b) quantificar catequinas e teaflavinas também em chás comercializados no Brasil.

RESUMO GERAL

Os flavonóides, mais precisamente flavonóis e flavanóis, têm merecido destaque nas publicações científicas. As evidências científicas da sua potencial ação contra doenças degenerativas, embora ainda com alguma controvérsia, são os propulsores dos estudos nas diversas fontes alimentícias. O chá é uma fonte rica destes compostos, assim como de outro grupo de polifenóis característico de chá preto: as teaflavinas.

Os teores dos flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol foram determinados em uma marca de ban-chá, duas marcas de chá verde e quatro marcas de chá preto. Três lotes para cada marca foram analisados em duplicata por cromatografia líquida de alta eficiência. A metodologia analítica consistiu de extração aquosa, transformação para as formas agliconas por hidrólise e cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Novapak C₁₈ (3,9 x 150 mm, 4µm) e como fase móvel, um gradiente de água e metanol, ambas em ácido fórmico. Quercetina (2,5 – 3,4 mg/g de folha) predominou em todas as amostras, seguida por kaempferol (1,0 – 2,0 mg/g de folha), com exceção de uma amostra na qual kaempferol e miricetina tiveram teores iguais. Houve variação entre os tipos de chás e mesmo entre marcas do mesmo tipo. Miricetina (traços – 1,9 mg/g de folha) foi o flavonol que mais variou e foi encontrado em nível menor nos chás pretos. Amostras de chás muito consumidas no Brasil também foram investigadas quanto à presença e teor destes flavonóis. Em chás de frutas (maçã e morango) e de ervas (erva doce, camomila, erva cidreira, hortelã, boldo, mate e erva mate), não foi detectada a miricetina, enquanto que quercetina foi encontrada em quatro chás (camomila, boldo, morango e erva

mate) e kaempferol, em dois chás (boldo e erva-mate), em concentrações de 0,4 a 2,5 e 0,4 a 2,6 mg/g de folha, respectivamente. Conclui-se que estes chás são fontes de flavonóis na dieta brasileira, embora com teores menores que em chás verde e preto.

O conteúdo de catequinas e teaflavinas também foi determinado nas mesmas amostras de chás verde e preto. Em chás verdes, os teores de catequinas variaram substancialmente: catequina, de 0,8 a 2,8 mg/g de folha; epigallocatequina, de 23 a 44; epigallocatequinagalato, de 26 a 50; epicatequina, de 4,4 a 8,5 e epicatequinagalato, de 4,6 a 7,3. Já em Ban-chá, os níveis (mg/g folha) foram: catequina 1,8; epigallocatequina, 8; epigallocatequinagalato, 11; epicatequina 2,3; epicatequinagalato, 3,1. No caso dos chás pretos, as concentrações de catequinas estiveram nas faixas, em mg/g folha, de: 10 a 40 de epigallocatequina, 14 a 37 de epigallocatequinagalato, 5 a 8,7 de epicatequina e de 10 a 21 de epicatequinagalato. As teaflavinas apresentaram variação de teores menor: entre 5 (teaflavina 3'-galato) e 13 mg/g de folha (teaflavina 3-3'-digalato). Não foram encontradas catequinas e teaflavinas em nenhuma das amostras de chás de maçã, morango, erva doce, camomila, erva cidreira, hortelã, boldo, mate ou erva mate.

Capítulo 1

Polifenóis em chás: importância, análise e composição

(Artigo a ser enviado ao Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos)

POLIFENÓIS EM CHÁS: IMPORTÂNCIA, ANÁLISE E COMPOSIÇÃO¹

Simara Matsubara, Delia B. Rodriguez-Amaya*²

RESUMO

Os flavonóides, mais precisamente flavonóis e flavanóis, têm merecido destaque nas publicações científicas. As evidências da sua ação potencial contra doenças degenerativas, embora ainda com alguma controvérsia, são os propulsores dos estudos nas diversas fontes alimentícias. O chá é uma fonte rica destes compostos, assim como de outro grupo de polifenóis característico de chá preto: as teaflavinas. No presente trabalho são revisados os métodos analíticos para estas importantes classes de compostos em chás verde e preto. Vários aspectos relevantes em uma metodologia analítica são abordados de forma a traçar um panorama da situação atual. Teores de catequinas, teaflavinas e flavonóis são apresentados a fim de realizar uma avaliação comparativa.

Palavras-chave: chá, polifenóis, flavonóides, atividade biológica, análise, composição.

SUMMARY

Flavonoids, particularly flavonols and flavanols, have drawn considerable attention in the scientific literature. Scientific evidences for their potential action against degenerative diseases, although still controversial to some extent, have been the incentive for the investigation of diverse food sources. Tea is a rich source of these compounds, as well as another group of polyphenols characteristic of black tea, the teaflavins. In this paper, the analytical methods for these important classes of compounds in green and black tea are reviewed. Various relevant aspects to an analytical methodology are addressed to give an insight of the present situation. Reported values of catechins, theaflavins and flavonols are presented to allow a comparative evaluation.

Keywords: tea, polyphenols, flavonoids, biological activities, analysis, composition.

1 Recebido para publicação em

2 Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, Campinas, SP, Brasil, CEP 13083-970; *e-mail*: delia@fea.unicamp.br

*A quem a correspondência deve ser enviada.

1 - INTRODUÇÃO

O chá tem sido consumido em muitos países há tempos e hoje é um produto de crescente interesse, devido às publicações científicas que mostram potenciais benefícios à saúde que a bebida pode trazer, como a diminuição do risco de doenças crônicas, principalmente câncer e doenças cardiovasculares. Este efeito benéfico é frequentemente atribuído à presença de polifenóis, sobretudo dos flavonóides, em sua composição. Como uma rica fonte destes compostos, o chá pode ser classificado como alimento funcional.

2 – EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE

Apesar dos estudos sobre os benefícios dos polifenóis à saúde humana receberem grande atenção do meio científico, resultando em numerosos artigos de revisão [15, 18, 23, 45, 58, 67], o número de estudos *in vivo* e seus resultados são ainda considerados inconsistentes ou insuficientes para comprovar definitivamente esta ação.

Os estudos *in vitro* encontram-se bem avançados, mostrando possíveis mecanismos de ação, principalmente de catequinas e teaflavinas, que cobrem todas as etapas do desenvolvimento do câncer. Na etapa de iniciação, os mecanismos são: redução da formação [62] e da ativação do carcinógeno [50, 57], aumento da detoxificação do carcinógeno [40], redução da ligação carcinógeno-DNA [36], atividade antioxidante [77] e redução da alquilação do DNA [60]. Na etapa seguinte, a promoção, os mecanismos são: redução da ligação do promotor [1, 16, 79], proteção da comunicação célula-célula [41] e redução de lipoperoxidação [29]. Por fim, na propagação, há a diminuição da conversão da

célula benigna a maligna [35], diminuição do crescimento de tumores [5, 51] e a redução da metástase [66].

Estudos com animais (ratos) são também expressivos e revelam que a administração de polifenóis de chá, principalmente as catequinas e teaflavinas, reduziu o número ou a proliferação de tumores no trato gastro-intestinal [17], cólon, [78], estômago [70, 73, 80], pulmão [70, 73, 80] e pele [48], induzidos por teleocidina, azoximetano, nitrosamina, benzo[a]pireno, tetradecanoilforbol acetato, dimetilbenzo[a]antraceno e luz ultravioleta B. Também utilizando nitrosamina e benzo[a]pireno como carcinógenos, extratos de chá verde tiveram ação em dois estágios da iniciação (aumento da detoxificação do carcinógeno e atividade antioxidante) e em dois da propagação (diminuição do crescimento de tumores) de tumores em pulmão e estômago de ratos [37]. A inibição do crescimento e/ou regressão de papilomas provocados por nitrosamina, tetradecanoilforbol acetato, dimetilbenzo[a]antraceno e luz ultravioleta B, foram mostrados em pele de ratos [74]. É importante notar que há diversidade de tipos de câncer estudados, assim como os carcinógenos empregados nos experimentos.

Os estudos epidemiológicos, no entanto, não forneceram resultados conclusivos ou consistentes. TAJIMA & TOMINAGA [64] não constataram uma correlação significativa entre o consumo de chás verde e preto com o risco de câncer de estômago e cólon em 550 japoneses. Já KONO *et al.* [43], também no Japão, observaram uma correlação inversa entre consumo de chá verde e a incidência de câncer gástrico em 2991 indivíduos. Outro estudo com 8000 japoneses [22] revelou uma correlação direta entre consumo de chás pretos e câncer no reto, enquanto que para câncer de próstata, a correlação foi inversa. No mesmo estudo, não houve correlação entre a ingestão de chá

preto e câncer pancreático e de bexiga. HERTOOG *et al.* [27], num estudo em sete países orientais e ocidentais e 12763 homens, não encontraram relação entre consumo de flavonóis e flavonas com mortalidade por câncer de pulmão e colo-retal. Para o câncer de estômago, o consumo destes flavonóides teve correlação direta com a mortalidade. Em pesquisas mais recentes, os resultados apresentam-se mais promissores. OHNO *et al.* [52] avaliaram a relação entre consumo de chá Okinawa (parcialmente fermentado) e a incidência de câncer de pulmão em 1000 japoneses, concluindo que houve correlação inversa entre eles, especialmente entre mulheres. Resultado similar foi constatado por JI [33] em 3618 chineses: a correlação inversa entre consumo de chá verde e câncer pancreático e colo-retal foi encontrada apenas entre mulheres japonesas dentre os participantes envolvidos no estudo. A pesquisa de SUGANUMA *et al.* [63], também com japoneses (8552 indivíduos), revelou que mulheres com consumo mínimo diário de 10 xícaras de chá verde manifestaram câncer de mama em média quatro anos mais tarde em relação às que consumiram menos de 3 xícaras.

Os estudos em animais a respeito da ação dos polifenóis sobre doenças cardiovasculares são poucos, mas concordantes. TIJBURG *et al.* [68] pesquisaram a eficácia dos chás verde e preto sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em coelhos, concluindo que o consumo de chá verde proporcionou uma tendência à redução, embora o chá preto não tivesse afetado significativamente a formação de lesões. IKEDA *et al.* [32], em estudo com ratos, observaram que as catequinas de chá verde, principalmente os ésteres galato, reduziram efetivamente a absorção de colesterol pelo intestino, pela redução da solubilidade micelar do colesterol.

Doenças cardiovasculares também foram relacionadas com consumo de chás em alguns estudos epidemiológicos. HERTOOG *et al.* [24] constataram entre idosos na Holanda, que a ingestão de flavonóides em chá preto e mortalidade por doenças do coração têm correlação inversa, assim como concluiu KELI *et al.* [39], também na Holanda, com relação a efeito protetor contra derrames. KNEKT *et al.* [42] na Finlândia, RIMM *et al.* [55] nos EUA e GELEIJNSE *et al.* [18] na Holanda, também observaram correlação inversa. Entretanto, na população de Welsh, Reino Unido, HERTOOG *et al.* [28] não observaram relação entre consumo de chá preto e incidência de doenças cardiovasculares isquêmicas, muito embora, nesta população o consumo do chá seja no leite, o que anularia a capacidade antioxidante da bebida. Diminuição dos níveis de colesterol foi constatada por KONO *et al.* [44], STENSVOLD *et al.* [61] e por GREEN *et al.* [20], no Japão, na Noruega e em Israel, respectivamente.

Inicialmente, os efeitos benéficos à saúde foram atribuídos somente ao chá verde, nos estudos subsequentes têm mostrado os mesmos efeitos pelo chá preto. Portanto, os benefícios podem ser trazidos não somente pelo chá verde do Oriente, mas existe uma perspectiva similar do Ocidente, referente ao chá preto [14].

Para que as dúvidas a respeito dos chás sejam esclarecidas, é imprescindível que mais dados confiáveis sobre os seus polifenóis constituintes sejam obtidos. Para isso, métodos analíticos capazes de quantificar com exatidão estes compostos de diferentes tipos de chá devem ser disponíveis, com a identificação igualmente confiável.

3 - CHÁS E POLIFENÓIS

Dentre os chás de maior consumo mundial estão os chás preto e verde. Respondendo por cerca de 78% deste consumo, o chá preto é altamente consumido na Europa e nos demais países ocidentais; o verde por sua vez detém 20% do mercado, com concentração de consumo no Oriente [45]. O Brasil não tem tradição de consumo de chás, mas registra-se um destacado crescimento de sua participação no mercado de bebidas, sendo a infusão de mate a mais consumida.

Os chás verde e preto são produzidos a partir de folhas da *Camellia sinensis*. O processamento do chá verde compreende a inativação da enzima polifenoloxidase por injeção direta de vapor ou aplicação de calor indireto. Em seguida, as folhas são secas e tostadas. No processamento do chá preto, a presença da polifenoloxidase é de extrema importância. É a enzima que promove, juntamente com o oxigênio, a oxidação das catequinas a teaflavinas. A primeira etapa do processamento é uma secagem das folhas. Em seguida, são trituradas em rolos para rompimento das paredes celulares e exposição das catequinas ao oxigênio do ar e à enzima contida no meio celular. Esta etapa é conhecida como fermentação apesar de não se tratar de um processo fermentativo propriamente dito. O termo consagrou-se há muito tempo, quando se atribuía a produção do gás carbônico do processo oxidativo a uma suposta fermentação. Por fim, as folhas são tostadas, onde a oxidação é interrompida pela aplicação de calor [65].

O chá mate é produzido tendo como matéria-prima *Ilex paraguariensis*. Seu processamento envolve basicamente etapas de trituração, secagem e tostagem das folhas. A erva mate difere do chá mate apenas pela ausência de etapa de tostagem.

Os flavonóides são compostos polifenólicos de origem vegetal. Dos inúmeros grupos conhecidos como flavonóides estão as flavonas, isoflavonas, antocianinas, flavonóis e flavanóis. Para o chá verde, os dois últimos são destacados. Um grupo de compostos característicos de chá preto é o das teaflavinas, que são polifenóis, mas não são classificados como flavonóides. São produtos de condensação dos flavanóis, mais conhecidas como catequinas.

Os flavonóis são flavonóides caracterizados pela presença dos grupos carbonílico na posição 4 e hidroxílico na posição 3 do anel C (Figura 1). São geralmente encontrados na natureza em sua forma glicosídica. O açúcar, ligado na posição 3 do anel C, é geralmente glicose, ramnose ou galactose. A sua presença confere caráter mais hidrossolúvel aos flavonóis, que são encontrados nos vacúolos das células vegetais. Apesar da dúvida em relação à forma em que os flavonóis são absorvidos, há trabalhos que mostram absorção na forma glicosídica [30, 31, 54], encontrando-as inclusive no plasma. Com respeito à metodologia analítica, grande parte dos trabalhos determina as agliconas.

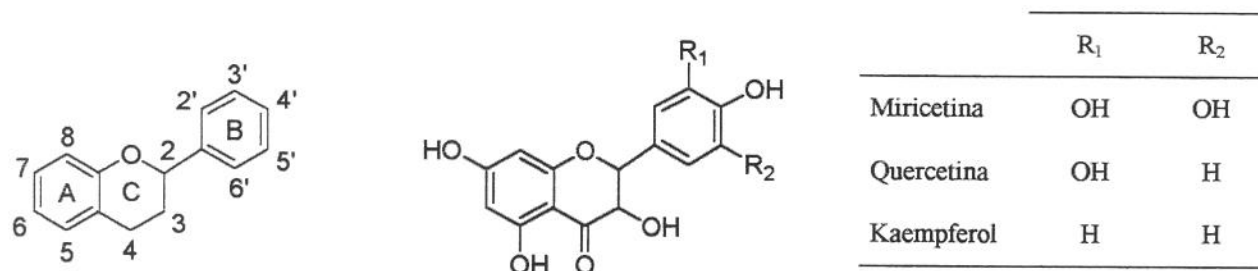
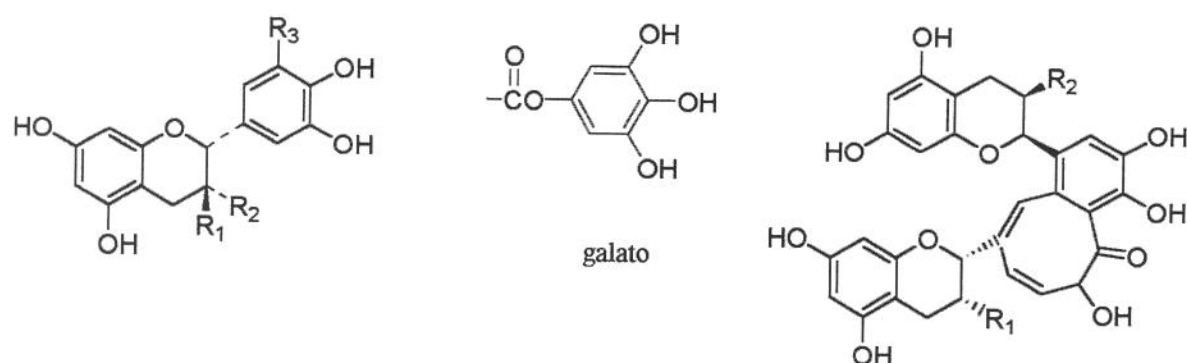


FIGURA 1. Estrutura básica de flavonóides e de flavonóis agliconas presentes em chás.

Os flavanóis, ou catequinas (Figura 2), correspondem a 75% do conteúdo de flavonóides encontrados no chá verde. Estes compostos conferem sabor à bebida e por esta razão, no Oriente, seu teor nas folhas é indicativo de qualidade e valor agregado ao produto. No processamento da folha e no preparo do chá, as catequinas podem sofrer epimerização. Trata-se de uma reação estereoquímica,, resultando na conversão das catequinas majoritárias em seus correspondentes isômeros [71]. Ocorre na posição 2 do anel C devido a diferentes causas como altos valores de pH e de temperatura e presença de íons. Durante o processamento do chá preto, por efeito térmico, esta reação pode ocorrer, acarretando uma diminuição da concentração das teaflavinas. [21].

As teaflavinas (Figura 2) são responsáveis por grande parte do sabor da infusão de chá preto. Contribuem também para a formação de cor, tendo coloração variando de amarela a marrom [7]. As teaflavinas são formadas pela condensação das catequinas duas a duas. Na Tabela 1 estão apresentados os pares de catequinas e as teaflavinas resultantes.



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂
(+)-Catequina	OH	H	H	Teaflavina	OH	OH
(-)-Epigallocatequina	H	OH	OH	Teaflavina 3-galato	galato	OH
(-)-Epigallocatequinagalato	H	galato	OH	Teaflavina 3'-galato	OH	galato
(-)-Epicatequina	H	OH	H	Teaflavina 3-3'-digalato	galato	galato
(-)-Epicatequinagalato	H	galato	H			

FIGURA 2. Estruturas das catequinas e teaflavinas

TABELA 1. As teaflavinas formadas a partir de pares de catequinas

CATEQUINAS	TEAFLAVINAS
Epicatequina (EC) + Epigallocatequina (EGC)	Teaflavina (TF1)
Epicatequina galato (ECG) + Epigallocatequina (EGC)	Teaflavina 3-galato (TF2)
Epicatequina (EC) + Epigallocatequina galato (EGCG)	Teaflavina 3'-galato (TF3)
Epicatequina galato (ECG) + Epigallocatequina galato (EGCG)	Teaflavina 3-3'-digalato (TF4)

Referência: ROBERTSON (1992) [56]

4 - METODOLOGIA ANALÍTICA

Os métodos analíticos empregados para a quantificação de flavonóides são bastante diversificados, embora utilize-se maciçamente a cromatografia, em especial a

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sem dúvida a técnica mais empregada. A eletroforese capilar é uma técnica bastante promissora, mas os relatos ainda são modestos em comparação à CLAE. Quanto à identificação dos compostos, é muito comum utilizar a detecção por espectrofotometria de absorção na região UV. Neste caso, a identificação é feita por comparação dos tempos de retenção e dos perfis de espectros de absorção obtidos de padrões isolados. A forma mais conclusiva de identificação é utilizar a espectrometria de massas.

4.1 - Extração

4.1.1 – Solvente extratante e o binômio tempo/temperatura

A extração mais empregada para polifenóis é a aquosa por infusão de folhas, sendo variáveis desta etapa a temperatura e o tempo de infusão. A temperatura mais comumente utilizada em extração aquosa é de 100°C, seja em infusão por três [9] ou dez minutos [25, 38, 47, 59], ou fervura por três minutos [72] ou uma hora [13]. Já TOYODA *et al.* [69] usaram banho para manter por cinco minutos a temperatura de 95°C, assim como LEE & ONG [46] para 90°C por 30 minutos. O banho foi utilizado a 80°C por AMAROWICZ & SHAHIDI [2] por uma hora e por BAILEY *et al.* [6] e DALLUGE *et al.* [12] por dez minutos. A temperatura de 70°C, mantida por 40 minutos foi a mais baixa para extração aquosa [8].

Quando o objetivo do trabalho é a avaliação quantitativa do teor dos polifenóis nas folhas e não nos chás como consumidos pelo homem, os solventes de

extração são os orgânicos e não a água. GOTO *et al.* [19] extraíram catequinas de chá verde com mistura de acetonitrila-água (1:1, v/v), mantida à temperatura ambiente por 40 minutos em constante agitação.

4.1.2 - Razão de folhas e água

No que diz respeito à quantidade de folhas em relação à água, há uma grande diversidade de proporções mencionadas. BRONNER *et al.* [9] utilizaram a mistura mais diluída: 0,3% (p/v). HERTOOG *et al.* [25] e LEE & ONG [46] empregaram a porcentagem de 1,0%, sendo as infusões de BAILEY *et al.* [6] e BAPTISTA *et al.* [8] um pouco mais concentradas (4,0 e 5,0%, respectivamente). AMAROWICZ & SHAHIDI [2] e LIN *et al.* [47] prepararam infusões com 10%, sendo esta a mais concentrada dentre as demais.

YOSHIDA *et al.* [81] investigaram o efeito da razão folhas:água na eficiência de extração das catequinas. Foram estudadas razões que variavam entre 0,2 e 3,0% e estudou-se o efeito nas catequinas individualmente. A variação da razão não alterou a eficiência da extração das formas livres, ou seja, epicatequina e epigallocatequina. Para as formas galato, epicatequina galato e epigallocatequinagalato, a eficiência foi menor em relação às catequinas livres e diminuiu com o aumento da proporção do chá até 2%, sendo que a 0,25 e 0,5% a eficiência foi de mais de 80% e, a partir de 2%, foi de apenas 65-70%, mantendo-se aparentemente constante em proporções maiores de chá.

4.1.3 - Epimerização de catequinas durante a extração

A epimerização de catequinas, que ocorre durante o processamento, pode também acontecer na extração, dependendo do pH, temperatura e presença de íons no meio aquoso de extração.

YOSHIDA *et al.* [81] estudaram três meios de extração com diferentes pHs (6, 7 e 8). Embora o conteúdo total de catequinas totais não variou, as catequinas individuais variaram. Com o aumento do pH, os níveis das catequinas majoritárias diminuíram e das minoritárias aumentaram, indicando ocorrência de epimerização.

WANG & HELLIWELL [71] compararam extratos a partir de água deionizada e água de torneira, que é a forma usual dos consumidores ingerirem o chá. Constataram que a presença dos íons na água de torneira favorecia grandemente a epimerização e potencializava o efeito da temperatura durante a extração. Em água deionizada, até 80°C a epimerização foi mínima, enquanto que para extrato em água de torneira, a 40°C a reação já era observada.

4.1.4 - Hidrólise de flavonóis

A hidrólise dos flavonóis glicosídios a suas formas agliconas é realizada em meio ácido com aquecimento. HERTOOG *et al.* [26] testaram os ácidos sulfúrico (H₂SO₄) e clorídrico (HCl) quanto à eficiência de hidrólise e constataram que o último apresentou as melhores taxas de conversão em diferentes tempos de reação.

HERTOG *et al.* [25] determinaram condições ótimas de hidrólise para algumas bebidas, inclusive o chá. Dentre as concentrações e tempos avaliados, com a temperatura fixada em 90°C, concluiu-se que para o chá, a concentração de 1,2M HCl mantendo por 2 horas foi a melhor condição. Apesar deste ser o método mais amplamente utilizado [34, 38], o trabalho de TOYODA *et al.* [69] propõe nova otimização do tempo de hidrólise para 30 minutos, mantendo as demais condições.

4.1.5 - Tipo de filtro

Na filtração das amostras ao final da extração, o cuidado na escolha do material filtrante é decisivo. GOTO *et al.* [19] e, mais tarde YOSHIDA *et al.* [81], estudaram diferentes materiais de membranas para filtração de chá verde: politetrafluoroetileno (PTFE) com superfície hidrofílica, celulose regenerada (RC), polivinildifluoreto (PVDF) e acetato de celulose (CA). As porcentagens de recuperação de catequinas foram maiores para PTFE, sendo que CA apresentou resultados razoáveis. Como os teores foram medidos para as catequinas separadamente, foi possível verificar que as formas galato são mais afetados pelos diferentes materiais, mostrando que o desempenho na recuperação destas formas é o fator limitante na escolha do filtro.

4.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.1 - Colunas

A fase estacionária consensualmente utilizada para separação dos polifenóis é de fase reversa C_{18} . As dimensões das colunas são variadas, assim como o tamanho das partículas.

Um dos objetivos principais do trabalho de DALLUGE *et al.* [12] foi a seleção de colunas para a separação de catequinas em chá verde. Foram testadas seis colunas, dentre elas fases mono e poliméricas, mas com diâmetro de partícula e dimensões fixas, $5\mu\text{m}$ e $4,6 \times 250 \text{ mm}$, respectivamente. Os resultados mostraram que a completa separação das catequinas e a qualidade cromatográfica são dependentes da coluna, com preferência pelas fases estacionárias desativadas, com sílica ultrapura e máxima cobertura de suporte. Presumiu-se que o motivo para esta constatação é que essas fases estacionárias são projetadas para eliminar interações indesejáveis entre analitos e superfície da sílica, melhorando a seletividade e diminuindo a formação de caudas nos picos. Dentre as colunas testadas, a melhor foi coluna Zorbax Eclipse XDB- C_{18} (Rockland Technologies Inc./Dupont), cuja descrição é: capeada, monomérica e de sílica ultrapura.

Em um outro trabalho, BAPTISTA *et al.* [8] compararam o desempenho de duas colunas distintas, ambas C_{18} . A coluna Ultropac Spherisorb ODS2 ($3\mu\text{m}$; $100 \times 4,6\text{mm}$) apresentou melhor resolução das catequinas presentes em chá verde. A sua vantagem em relação à outra coluna, Novapak C_{18} ($4\mu\text{m}$; $150 \times 3,9\text{mm}$) (também utilizada

por KARAKAYA & EL [38]), foi decorrente da sua maior hidrofobicidade, porcentagem de carbonos (12 contra 7,3% da Novapak) e menor tamanho de partículas. Mais tarde, mais duas colunas foram avaliadas [72], Kingsorb e Nucleosil, ambas C₁₈ e de mesmas dimensões: 5µm e 150 x 4,6mm. A melhor resolução foi mostrada pela Kingsorb.

A temperatura em que a coluna é mantida durante o processo cromatográfico tem importância na diminuição de tempos de retenção e na resolução de picos. GOTO *et al.* [19] observaram em uma avaliação de diferentes temperaturas de forno (30, 40 e 50°C), que à medida que a temperatura aumentava, os tempos de retenção de todos os analitos diminuía, mas a magnitude da variação era diferente para cada composto. Para a sequência do trabalho, os autores utilizaram a temperatura de 40°C. Esta escolha é reforçada pelo seu amplo uso em outros trabalhos, como em GOTO *et al.* [19], TOYODA *et al.* [69] e CHANG *et al.* [10]. BAPTISTA *et al.* [8] realizaram estudo similar, variando a temperatura e alcançando 50°C. O valor escolhido foi de 35°C, por oferecer melhor resolução. Temperaturas um pouco mais baixas, 32°C ou 30°C foram empregadas por LEE & ONG [46], WANG & HELLIWELL [71] e WANG *et al.* [72].

4.2.2 - Fases móveis

A presença de ácido na fase móvel para separação de flavonóides é essencial, tanto para a resolução dos compostos e especialmente para a diminuição de caudas nos picos [12]. Esta constatação converge com a frequência em que o ácido é empregado em fases móveis nas várias publicações sobre o assunto. Muitos deles

estudaram a concentração e o tipo de ácido, mas sua presença é, indubitavelmente um consenso.

As fases móveis constam, de maneira geral, de metanol ou acetonitrila associados às soluções diluídas dos ácidos. Quando a fase orgânica é o metanol, os ácidos mais utilizados são o acético [13, 53] e o fórmico [34, 47]. Em todos os casos, a concentração dos ácidos não ultrapassa 1,0% (0,5 e 0,1% para acético e 0,3 e 1,0% para fórmico). Além dos citados, o ácido ortofosfórico foi utilizado por WANG e HELLIWELL [71] a 0,1% e o ácido fosfórico a 0,5% por TOYODA *et al.* [69]. DING *et al.* [13] optaram pelo ácido acético após testes comparativos realizados com ácido fosfórico. A concentração mencionada também foi obtida através de testes preliminares, que mostraram que o efeito da concentração do ácido sobre a separação é pequeno quando compreendida pela faixa entre 0,05 e 0,5%.

Junto com a acetonitrila, o ácido acético também é muito utilizado [59], em concentrações que alcançam 2% [6]. Outros ácidos são o trifluoroacético a 0,035% [46], o ortofosfórico a 0,1% [8] e o fosfórico a 0,05% [19]. Também foram utilizados tampões, como o fosfato em pH 2,4, usado por HERTOOG *et al.* [25] e mais tarde, por KARAKAYA & EL [38], e o tampão acetato [9] em pH mais elevado, 4,5.

4.2.3 - Detecção

O detector de arranjo de diodos é o mais utilizado dentre as publicações acerca de flavonóides e teaflavinas em que se usa CLAE como técnica analítica.

A quantificação de flavonóis foi feita a 349 nm por TOYODA *et al.* [69], e entre 365 e 370nm por HERTOOG *et al.* [25] e por CROZIER *et al.* [11]. BAILEY *et al.* [6] fizeram as medidas a 380 nm, destacando ainda, em seu trabalho, que esse grupo de compostos apresenta outra faixa de máximo de absorção, em torno de 255 e 269nm.

As catequinas têm máximo de absorção também em dois comprimentos de onda distintos: 227 e 275 nm [6]. Muitos autores fizeram a detecção em 280 nm [2, 6, 8, 47, 53, 59]. No entanto, BRONNER *et al.* [9], DALLUGE *et al.* [12], LEE & ONG [46] e WANG *et al.* [72] usaram 210 nm, sendo esta escolha justificada, pelos últimos autores, pela razão sinal/ruído melhor comparado a leituras a 280 nm. Por outro lado, GOTO *et al.* [19] e DING *et al.* [13] utilizaram 231 nm e CHANG *et al.* [10], 270 nm, por perceberem que a 210 nm, apesar da sensibilidade ser três vezes maior, a faixa de linearidade foi substancialmente menor.

BAILEY *et al.* [6] monitoraram as teaflavinas em 280, 380, 460 e 510 nm. SHAO *et al.* [42] quantificaram as teaflavinas a 450 nm, e LEE & ONG [32] a 205 nm.

ARTS & HOLLMAN [4] compararam os detectores de fluorescência e de ultravioleta (UV) para catequinas em frutas e legumes. Como esperado, o de fluorescência apresentou limites de detecção dez vezes maiores que o de UV. Catequina e epicatequina apresentaram alta fluorescência (emissão) em 310 nm, quando excitados a 280 nm. No entanto, epigallocatequina, epigallocatequinagalato e epicatequinagalato mostraram menor fluorescência que catequina e epicatequina, um problema que tentaram contornar sem sucesso.

5 - COMPOSIÇÃO DE POLIFENÓIS EM CHÁS

5.1 - Catequinas

As catequinas, dentre os flavonóides estudados em chás, é a classe com maior número de trabalhos, sobretudo de quantificação. As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam teores no extrato líquido e nas folhas. Os valores apresentados revelam grande variação entre amostras. Embora grande parte disso possa ser atribuída à variação natural das amostras, devido a fatores como variabilidade ambiental no cultivo, considerando o grau de variação entre resultados obtidos por diferentes laboratórios, uma parte é aparentemente proveniente da análise, principalmente do preparo do extrato. No entanto, existe variação mesmo entre resultados provenientes de extrações aquosas e entre resultados obtidos por meio de solventes orgânicos.

TABELA 2. Composição de catequinas de chás verde e preto em amostras líquidas

Referência	Técnica analítica	Amostra	Extração	Concentração (µg/mL)				
				C	EC	ECG	EGC	EGCG
Chás verdes								
[76]	Elektroforese capilar	Chá enlatado A	Pronto para consumo	96,4	48,3	46,5	24,4	188,5
		Chá enlatado B		42,3	42,6	36,4	33,7	163,2
		Chá enlatado C		22,4	33,5	21,6	15,9	124,7
		Chá enlatado D		12,8	36,3	26,4	25,5	156,6
	CLAE	Chá enlatado D		11,5	34,4	27,7	25,8	163,5
[72]	CLAE	Gunpowder	3 g/150 mL água/5 min	6,9	55,8	42,6	297,0	326,0
		RGT		12,2	64,8	50,3	310,0	314,0
		Sencha		14,1	95,4	49,2	362,0	288,0
[9]	CLAE	Dragon Well	0,25 g/80 mL água/3 min	na	10,0	30,0	20,0	60,0
		Dragon Well		na	20,0	50,0	40,0	90,0
[49]	CLAE	Chá	Pronto para consumo	8	27	69	39	286
Chás pretos								
[76]	Elektroforese capilar	Chá enlatado A	Pronto para consumo	36,1	10,5	25,8	31,3	9,2
		Chá enlatado B		22,6	12,6	33,4	24,6	36,4
		Chá enlatado C		14,5	20,6	23,8	28,8	24,8
		Chá enlatado D		17,4	22,4	23,6	21,8	48,8
	CLAE	Chá enlatado D		15,8	22,7	25,8	21,3	54,1
[72]	CLAE	Keemun	3 g/150 mL água/5 min	nd	nd	11,9	9,0	9,5
		Sri Lanka		5,0	14,5	29,2	18,4	11,6
[9]	CLAE	Lipton	2,2 g/237 mL água/3 min	na	40,0	110,0	60,0	120,0
[49]	CLAE	Chá	Pronto para consumo	4	7	20	5	29
[3]	CLAE	English mélange (Albert Heijn)	2 g/200 mL água/5 min	5,2	22,1	71,4	12,2	56,0
		English mélange (Pickwick DE)		3,5	12,7	46,6	6,4	27,2
		Ceylon (Albert Heijn)		8,7	62,4	100,0	92,7	128,4
		Ceylon (Pickwick DE)		8,8	47,7	79,1	88,4	100,4
		Earl Grey (Albert Heijn)		6,0	13,5	70,5	2,9	51,3
		Earl Grey (Pickwick DE)		6,2	15,1	60,6	6,5	43,7

Catequina (C), epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina (EGC), epigallocatequina galato (EGCG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não avaliado (na), não detectado (nd)

TABELA 3. Composição de catequinas em folhas de chás verdes

Referência	Técnica analítica	Amostra	Concentração (mg/g folhas)				
			C	EC	ECG	EGC	EGCG
[12]	CLAE	Lung Ching	0,6	3,8	3,2	15,4	21,7
[59]	CLAE	Quingmao 1	66,4	20,0	144,8	19,0	65,2
		Quingmao 2	68,8	21,6	150,8	20,6	71,2
		Folha “steamed” 1	42,0	26,0	132,8	18,0	71,6
		Folha “steamed” 2	44,4	20,0	139,6	14,0	76,0
[47]	CLAE	Fu-Chien Mao-Feng	nd	0,1	0,4	0,1	1,5
		He-Nan Hsin-Yang Mao-Chien	nd	0,1	0,3	0,1	1,8
		Hu-Pei He-Feng Fu-His	nd	nd	0,3	nd	1,7
		Chue-Chiang longjing	nd	6,8	1,7	3,0	1,7
		Hu-Pei San-Hsia Mao-Chien	nd	nd	0,3	nd	1,2
		Shan-His Tsu-Yang	nd	nd	0,2	nd	1,4
		He-Nan Hsin-Yang Yun-Woo	nd	nd	0,3	nd	1,4
		Che-Chiang Hang-Chou longjing	nd	nd	0,5	nd	1,2
		An-Hui Huang-Shan Yun-Woo	nd	nd	0,3	nd	0,9
		An-Hui Pi-Luo-Chun	nd	nd	0,3	nd	0,9
		Bei-Jing Mo-Li-Hua	nd	0,1	0,4	0,1	1,6
		Fu-Chien Hu-Chiu Mo-Li-Hua	nd	nd	0,2	0,1	1,3
		Ssu-Chuan Cheng-Tou Mo-Li-Hua	nd	nd	0,2	nd	1,0
		Ssu-Chuan Yung-Chuan Mo-Li-Hua	nd	0,1	0,3	0,1	1,4
		San-Shya, Taipei longjing	nd	0,1	0,3	0,1	1,3
[13]	CLAE	Yunnan	0,1	1,3	0,4	0,6	1,0
		Guangdong	0,1	0,7	0,3	0,8	0,7
		Jinghua	nd	0,8	1,4	0,4	0,6
[53]	CLAE	Loong Ching	na	0,2	0,1	0,4	0,4
		Grand Tea Co.	na	0,1	0,1	0,4	0,3
		Special Chunmee	na	0,1	0,1	0,4	0,3
		Jasmine Tea - Fujian	na	0,1	0,1	0,3	0,3
		Sen Cha Uji Tsuyu	na	0,2	0,1	0,5	0,4
		Daigo Sen Cha	na	0,2	0,1	0,5	0,2
		Lung Ching China	na	0,2	nd	0,5	0,3
		Jamine Tea ‘Bulk’	na	0,1	0,1	0,3	0,4
[19]	CLAE	High Grade Matcha	na	nd	0,1	0,2	0,6
		Low Grade Matcha	na	0,1	0,2	0,3	0,8
		High Grade Sencha	na	0,1	0,2	0,4	0,8
		Low Grade Sencha	na	0,1	0,2	0,4	0,9

Catequina (C), epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina (EGC), epigallocatequina galato (EGCG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não avaliado (na), não detectado (nd)

TABELA 4. Composição de catequinas em folhas de chás pretos

Referência	Técnica analítica	Amostra	Concentração (mg/g folhas)				
			C	EC	ECG	EGC	EGCG
[59]	CLAE	Preto 1	30,0	13,6	87,2	13,0	10,0
		Preto 2	24,8	176,0	86,0	15,6	6,4
		Pu' er 1(1993)*	1,6	nd	nd	nd	3,6
		Pu' er 2 (1993)	1,6	nd	nd	nd	4,0
		Pu' er (1920)	0,6	nd	nd	nd	1,6
		Pu' er (1930)	14,4	1,2	22,8	nd	9,6
		Pu' er (1940)	16,0	2,0	2,3	nd	7,6

Catequina (C), epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina (EGC), epigallocatequina galato (EGCG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não avaliado (na), não detectado (nd)

5.2 - Teaflavinas

Ao contrário do que se observa para catequinas, as teaflavinas não têm grande destaque em trabalhos de quantificação. Um motivo possível esteja na falta de disponibilidade de padrões: os comerciais apresentam-se em forma de mistura das quatro teaflavinas. Na Tabela 5, os resultados de teaflavinas individuais foram obtidos com padrões isolados por cromatografia em coluna clássica.

TABELA 5. Teores de teaflavinas em chá preto

Refs.	Técnica analítica	Amostras	Concentração (mg/g folhas)				
			TF1	TF2	TF3	TF4	TF totais
[59]	CLAE	Chá preto 1	4,8	4,5	1,3	2,7	-
		Chá preto 2	4,4	4,0	1,3	2,9	-
[46]	CLAE	Puerh	-	-	-	-	1,03

Teaflavina (TF1), teaflavina 3-galato (TF2), teaflavina 3'-galato (TF3), teaflavina 3-3'-digalato (TF4), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.3 - Flavonóis

Miricetina, quercetina e kaempferol são os flavonóis reconhecidamente mais presentes em chás, comumente nas formas glicosídicas. O número de trabalhos sobre os teores de flavonóis em chás ainda é pequeno, e as concentrações relatadas são bastante diferentes (Tabelas 6 e 7). Parte disto pode ser atribuída às variações naturais devido a fatores como condições de cultivo e forma de processamento das folhas, como mostra a variação dos resultados de HERTOOG *et al.* [25] obtidos com o mesmo procedimento analítico no mesmo laboratório. Porém, a magnitude de variação entre resultados de diferentes laboratórios indica que a variabilidade analítica é também envolvida, demonstrando que o aprimoramento da metodologia ainda é necessário, como no caso de catequinas e teaflavinas.

TABELA 6. Composição de flavonóis agliconas de chás verde e preto em amostras líquidas

Ref.	Técnica analítica	Amostras	Extração	Concentração (µg/mL)		
				M	Q	K
[25]	CLAE	Pickwick DE melange preto	4 g/500 mL água/5 min	3,2	19,0	15,0
		Van Nelle melange preto		2,8	17,0	14,0
		Albert Heijin melange preto		3,0	17,0	13,0
		Pickwick DE Earl Grey preto		3,5	21,0	17,0
		Lay's English Breakfast preto		1,7	10,0	6,3
		ST. Michael preto extra forte	5 g/500 mL água/5 min	2,5	21,0	15,0
		Lipton Brisk preto		5,2	25,0	16,0
		Jacksons Earl Grey preto		2,5	12,0	16,0
		Lay's After Dinner preto		2,5	10,0	12,0
		Chá verde japonês "Sencha"		12,0	23,0	15,0
		Chá verde chinês "Gunpowder"		5,2	14,0	9,1
[38]	CLAE	Chá preto	5 g/250 mL água/10 min	na	34,8±9	110±9
[34]	CLAE	Chá, sem especificação	Pronto para consumo	0,1±0,1	0,1±0,1	0,2±0,1
[49]	CLAE	Chá preto	Pronto para consumo	3,0	17,0	14,0
		Chá verde	Pronto para consumo	8,0	23,0	13,0

Miricetina (M), quercetina (Q), kaempferol (K), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não avaliado (na)

TABELA 7. Composição de flavonóis agliconas em folhas de chás verde e preto.

Referência	Técnica analítica	Amostras	Concentração (mg/g folhas)		
			M	Q	K
[69]	CLAE	Chá verde japonês "Sencha"	1,3±0,1	1,6±0,2	1,5±0,2

Miricetina (M), quercetina (Q), kaempferol (K), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Crescentes evidências sobre o papel dos polifenóis na saúde humana são encontrados na literatura, especialmente em relação aos estudos bioquímicos que apontam mecanismos de ação ao longo de todo o processo de carcinogênese e de outras doenças degenerativas. Estão faltando estudos epidemiológicos e de intervenção. Com isso, há necessidade de mais dados confiáveis sobre os níveis destes compostos em alimentos. Os dados existentes são ainda restritos e bastante variáveis. Para chegar às bases de dados adequadas, maiores esforços no aprimoramento e validação dos métodos são necessários. Cabe ressaltar que não foi encontrada nenhuma publicação sobre polifenóis de chás brasileiros.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]AGARWAL, R.; KATIYAR, S.K.; ZAIDI, S.I.A.; MUKHTAR, H. Cancer Res., 52: 3582-3588, 1992.
- [2]AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. Food Res. Int., 29:71-76, 1996.
- [3]ARTS, I.C.W.; van de PUTTE, B.; HOLLMAN, P.C.H. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. J. of Agric. and Food Chem. 48: 1752-1757, 2000.
- [4]ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. J. of Agric. and Food Chem., 46: 5156-5162, 1998.
- [5]AUSTIN, C.A.; PATEL, S.; ONO, K.; NAKANE, H.; FISHER, L.M. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. Biochem. J., 282: 883-889, 1992.
- [6]BAILEY, R.G.; McDOWELL, I.; NURSTEN, H.E. Use of HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor. J. of the Sci. of Food and Agric., 52: 509-525, 1990.

[7]BALENTINE, D.A.; WISEMAN, S.A.; BOUWENS, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.*, 37: 693-704, 1997.

[8]BAPTISTA, J. A. B.; TAVARES, J. F. P.; CARVALHO, R. C. B. Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC. *Food Res. Int.*, 31: 729-736, 1998.

[9]BRONNER, W.E.; BEECHER, G.R. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, 805: 137-142, 1998.

[10]CHANG, J.C.; CHIU, K.; CHEN, Y.; CHANG C. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. *Food Chem.*, 68: 109-113, 2000.

[11]CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M.E.J.; Mc DONALD, M.S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, 761: 315-321, 1997.

[12]DALLUGE, J. J.; NELSON, B. C.; THOMAS, J. B.; SANDER, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, 793: 265-274, 1998.

- [13]DING, M.; YANG, H.; XIAO, S. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, 849: 637-640, 1999.
- [14]DREOSTI, I.E. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr. Rev.*, 54: s51-s58, 1996.
- [15]DUFRESNE, C; FARNWORTH, E. Tea, kombucha, and health: a review. *Food Res. Int.*, 33: 409-421, 2000.
- [16]FUJIKI, H.; YOSHIZAWA, S.; HORIUCHI, T.; SUGANUMA, M.; YATSUNAMI, J.; NISHIWAKI, S. *et al.* Anticarcinogenic effects of (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.*, 21: 503-509, 1992.
- [17]FUJITA, Y.; YAMANE, T.; TANAKA, M.; KUWATA, K.; OKUZUMI, J.; TAKAHASHI, T.; FUJIKI, H.; OKUDA, T. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. of Cancer Res.*, 80: 503-505, 1989.
- [18]GELEIJNSE, J.M.; LAUNER, L.J.; HOFMAN, A.; POLS, H.A.P.; WITTEMAN, J.C.M. The flavonoids may protect against atherosclerosis. *Arch. of Internal Med.*, 159: 2170-2174, 1999.

- [19]GOTO, T.; YOSHIDA, Y.; KISO, M.; NAGASHIMA, H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. of Chrom. A*, 749: 295-299, 1996.
- [20]GREEN, M.S.; HARARI, G. Association of serum lipoproteins and health-related habits with coffee and tea consumption in free-living subjects examined in the Israeli CORDIS Study. *Prev. Med.*, 21: 532-545, 1992.
- [21]HARLER, C.R. 1970. Tea manufacture. Oxford University Press, London.
- [22]HEILBRUN, L.K.; NOMURA, A.; STEMMERMANN, G.N. Black tea consumption and cancer risk: a prospective study. *Brit. J. of Cancer*, 54: 677-683, 1986.
- [23]HERTOG, M.G.L. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. of the Nutr. Soc.*, 55: 385-397, 1996.
- [24]HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342: 1007-1011, 1993.
- [25]HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. of Agric. and Food Chem.*, 41: 1242-1246, 1993.

[26]HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 40: 1591-1598, 1992.

[27]HERTOG, M.G.L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F. *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch. of Internal Med.*, 155: 381-386, 1995.

[28]HERTOG, M.G.L.; SWEETNAM, P.M.; FEHILY, A.M.; ELWOOD, P.C.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1489-1494, 1997.

[29]HO, C.; CHEN, Q.; SHI, H.; ZHANG, K.; ROSEN, R.T. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Med.*, 21:520-525, 1992.

[30]HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. and Pharmacotherapy*, 51: 305-310, 1997.

[31]HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chem. Toxicol.*, 37: 937-942, 1999.

[32]IKEDA, I.; IMASATO, Y.; SASAKI, E.; NAKAYAMA, M.; NAGAO, H.; TAKEO, T.; YAYABE, F. SUGANO, M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim. Bioph. Acta*, 1127: 141-146, 1992.

[33]JI, B. Green tea and cancer. *Food and Chem. Toxicol.*, 35: 529, 1997.

[34]JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones, in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. of Chrom. A*, 799: 101-110, 1998.

[35]KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Protection against malignant conversion of chemically induced benign skin papillomas to squamous cell carcinomas in SENCAR mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. *Cancer Res.*, 53: 5409-5412, 1993.

[36]KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R.; WANG, Z.Y.; BHATIA, A.K.; MUHKTAR, H. (-)-Epigallocatechin-3-gallate in *Camellia sinensis* leaves from the Himalayan region of Sikkim: inhibitory effects against biochemical events in tumor initiation in SENCAR mouse skin. *Nutr. Cancer*, 18:73-83, 1992. Citado em: DREOSTI, I.E. Bioactive ingredients: antioxidants an polyphenols in tea. *Nutr. Rev.*, 54: s51-s58, 1996.

[37]KATIIYAR, S.K.; AGARWAL, R.; ZAIM, M.T.; MUKHTAR, H. Protection against N-nitrosodiethylamine and benzo[a]pyrene-induced forestomach and lung tumorigenesis in A/J mice by green tea. *Carcinogenesis*, 14: 849-855, 1993.

[38]KARAKAYA, S.; EL, S.N. Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chem.*, 66: 289-292, 1999.

[39]KELI, S.O.; HERTOOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; KROMHOUT, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. *Arch. of Internal Med.*, 156: 637-642, 1996.

[40]KHAN, S.G.; KATIIYAR, S.K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.*, 52: 4050-4052, 1992.

[41]KLAUNIG, J.E. Chemopreventive effects of green tea components on hepatic carcinogenesis. *Prev. Med.*, 21: 510-519, 1992.

[42]KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit. Med. J.*, 312: 478-481, 1996.

[43]KONO, S.; IKEDA, M.; TOKUDOME, S.; KURATSUNE, M. A case-control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Jpn. J. of Cancer Res., 79: 1067-1074, 1988.

[44]KONO, S.; SHINCHI, K.; IKEDA, N.; YANAI, F.; IMANISHI, K. Green tea consumption and serum lipid profiles: a cross-sectional study in Northern Kyushu, Japan. Prev. Med., 21: 526-531, 1992.

[45]KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of teapolyphenols. Mut. Res./Fund. and Mol. Mech. of Mutagenesis, 436: 69-97, 1999.

[46]LEE, B.; ONG, C. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. J. of Chrom. A, 881: 439-447, 2000.

[47]LIN, J.; LIN, C.; LIANG, Y.; LIN-SHIAU, S.; JUAN, I. Survey of catechins, gallic acid and methylxantines in green, oolong, pu-erh and black teas. J. of Agric. and Food Chem., 46: 3635-3642, 1998.

[48]LU, Y.; LOU, Y.; XIE, J.; YEN, P.; HUANG, M.; CONNEY, A.H. Inhibition effect of black tea on the growth of established skin tumors in mice: effects on tumor size, apoptosis, mitosis and bromodeoxyuridine incorporation into DNA. Carcinogenesis, 18: 2163-2169, 1997.

[49]MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *J. Agric. and Food Chem.*, 48, 5834-5841, 2000.

[50]MUKHTAR, H.; WANG, Z.; KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev. Med.*, 21: 351-360, 1992.

[51]NISHIDA, H.; OMORI, M.; FUKUTOMI, Y.; NINOMIYA, M.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; MORIWAKI, H.; MUTO, Y. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. *Jpn. J. of Cancer Res.*, 85: 221-225, 1994.

[52]OHNO, Y.; WAKAI, K.; GENKA, K.; OHMINE, K.; KAWAMURA, T.; TAMAKOSHI, A.; AOKI, R.; SENDA, M.; HAYASHI, Y.; NAGAO, K.; FUKUMA, S.; AOKI, K. Tea consumption and lung cancer risk: a case-control study in Okinawa, Japan. *Jpn. J. of Cancer Res.*, 86: 1027-1034, 1995.

[53]PRICE, W.E.; SPITZER, J.C. Variations in the amounts of individual flavanols in a range of green teas. *Food Chem.*, 47: 271-276, 1993.

[54]RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.*, 2: 152-159, 1997.

- [55]RIMM, E.B.; KATAN, M.B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals of Internal Med.*, 125: 384-389, 1996.
- [56]ROBERTSON, A. The chemistry and biochemistry of black tea production – the non-volatiles. In: WILLSON, K.C. e CLIFFORD, M.N. *Tea: cultivation to consumption*. London: Chapman & Hall, 1992. cap. 17: p.555-601.
- [57]RODGERS, E.H.; GRANT, M.H. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem.-Biol. Interaction*, 116: 213-228, 1998.
- [58]SCHRAMM, D.D.; GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *J. of Nutr. Biochem.*, 9: 560-566, 1998.
- [59]SHAO, W.; POWELL, C.; CLIFFORD, M.N. The analysis by HPLC of green, black and pu'er teas produced in Yunnan. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 69: 535-540, 1995.
- [60]SHI, S.T.; WANG, Z.; SMITH, T.J.; HONG, J.; CHEN, W.; HO, C.; YANG, C.S. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation and lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Res.*, 54: 4641-4647, 1994.

[61]STENSVOLD, I.; TVERDAL, A.; SOLVOLL, K.; FOSS, O.P. Tea consumption. Relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev. Med.*, 21: 546-553, 1992.

[62]STICH, H.F. Teas and tea components as inhibitors of carcinogen formation in model systems and man. *Prev. Med.*, 21: 377-384, 1992.

[63]SUGANUMA, M.; OKABE, S.; SUEOKA, N.; SUEOKA, E.; MATSUYAMA, S.; IMAI, K.; NAKACHI, K.; FUJIKI, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mut. Res./Rev. in Mut. Res.*, 428: 339-344, 1999.

[64]TAJIMA, K.; TOMINAGA, S. Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn. J. of Cancer Res.*, 76: 705-716, 1985.

[65]TAKEO, T. Green tea and semi-fermented teas. In WILLSON, K.C. e CLIFFORD, M.N. *Tea: cultivation to consumption*. London: Chapman & Hall, 1992. cap. 13: p.413-454.

[66]TANIGUCHI, S.; FUJIKI, H.; KOBAYASHI, H. *et al.* Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanomacell lines. *Cancer Lett.*, 65: 51-54, 1992. Citado em: DREOSTI, I.E. Bioactive ingredients: antioxidants an polyphenols in tea. *Nutr. Rev.*, 54: s51-s58, 1996.

[67]TIJBURG, L.B.M.; MATTERN, T.; FOLTS, J.D.; WEISGERBER, U.M.; KATAN, M.B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.*, 37: 771-785, 1997.

[68]TIJBURG, L.B.M.; WISEMAN, S.A.; MEIJER, G.W.; WESTSTRATE, J.A. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*, 135: 37-47, 1997.

[69]TOYODA, M.; TANAKA, K.; HOSHINO, K.; AKIYAMA, H.; TANIMURA, A.; SAITO, Y. Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds if health tea and green tea infusions. *J. of Agric. and Food Chem.*, 45: 2561-2564, 1997.

[70]WANG, Z.Y.; AGARWAL, R.; KHAN, W.A.; MUKHTAR, H. Protection against benzo[a] pyrene- and N-nitrosodiethylamine-induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis*, 13:1491-1494, 1992.

[71]WANG, H.; HELLIWELL, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. Food Chem., 70: 337-344, 2000.

[72]WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. Food Chem., 68: 115-121, 2000.

[73]WANG, Z.Y.; HONG, J., HUANG, M.; REUHL, K.R.; CONNEY, A.H.; YANG, C.S. Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone- induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. Cancer Res., 52: 1943-1947, 1992.

[74]WANG, Z.Y.; HUANG, M.; HO, C.; CHANG, R.; MA, W.; FERRARO, T.; REUHL, K.R.; YANG, C.S.; CONNEY, A.H. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. Cancer Res., 52: 6657-6665, 1992.

[75]WANG, Z.Y.; WANG, L.; LEE, M.; HO, C.; HUANG, M.; CONNEY, A.H.; YANG, C.S. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by green and black tea. Carcinogenesis, 16: 2143-2148, 1995.

[76]WATANABE, T.; NISHIYAMA, R.; YAMAMOTO, A.; NAGAI, S.; TERABE, S. Simultaneous analysis of individual catechins, caffeine, and ascorbic acid in commercial

canned green and black teas by micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Sci.*, 14: 435-438, 1998.

[77]XU, Y.; HO, C.; AMIN, S.G.; HAN, C.; CHUNG, F. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.*, 52: 3875-3879, 1992.

[78]YAMANE, T.; HAGIWARA, N.; TATEISHI, M.; AKACHI, A.; KIM, M.; OKUZUMI, J.; KITAO, Y.; INAGAKE, M.; KUWATA, K.; TAKAHASHI, T. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenols fraction. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82: 1336-1339, 1991.

[79]YAMANE, T.; TAKAHASHI, T.; KUWATA, K.; OYA, K.; INAGAKE, M.; KITAO, Y.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Cancer Res.*, 55: 2081-2084, 1995.

[80]YANG, G.; LIU, Z.; SERIL, D.N.; LIAO, J.; DING, W.; KIM, S.; BONDOC, F.; YANG, C.S. Black tea constituents, theaflavins, inhibit 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis*, 18: 2361-2365, 1997.

[81]YOSHIDA, Y.; KISO, M.; GOTO, T. Efficiency of the extraction of catechins from green tea. Food Chem., 67: 429-433, 1999.

7. AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa à primeira autora.

Capítulo 2

Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil

(Artigo a ser enviado ao Food Chemistry)

Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil

Simara Matsubara & Delia B. Rodriguez-Amaya*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, Campinas, SP, Brasil, CEP 13083-970

Resumo

Os teores de miricetina, quercetina e kaempferol foram determinados em uma marca de ban-chá, duas de chá verde e quatro de chá preto. Analisou-se três lotes para cada marca em duplicata por cromatografia líquida de alta eficiência. Quercetina (2,5 – 3,4 mg/g de folha) predominou em todas as amostras, seguida por kaempferol (1,0 – 2,0 mg/g de folha), com exceção de uma amostra na qual kaempferol e miricetina tiveram teores iguais. Houve variação entre os tipos de chás e mesmo entre marcas do mesmo tipo. Miricetina (traços – 1,9 mg/g de folha) foi o flavonol que mais variou e que esteve em menor nível nos chás pretos. Amostras de chás muito consumidas no Brasil também foram investigadas quanto à presença e teor destes flavonóis. Em chás de frutas (maçã e morango) e de ervas (erva doce, camomila, erva cidreira, hortelã, boldo, mate e erva mate), não foi detectada miricetina, enquanto que quercetina foi encontrada em quatro chás (camomila, boldo, morango e erva mate) e kaempferol, em dois chás (boldo e erva-mate), em concentrações de 0,4 a 2,5 e 0,4 a 2,6 mg/g de folha, respectivamente. Conclui-se que estes chás são fontes de flavonóis na dieta brasileira, embora com teores menores que em chás verde e preto.

Palavras-chave: chás, flavonóis, miricetina, quercetina, kaempferol

1. Introdução

Flavonóides são polifenóis que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal e são comuns em dietas de todo o mundo. São metabólitos secundários de plantas, e podem ser subdivididos em 6 classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas. O que diferencia os flavonóis dos demais flavonóides é a presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4) no anel C (Fig. 1). Os flavonóis ocorrem em alimentos geralmente como O-glicosídeos, com mono, di ou trissacarídeos ligados em sua maioria, na posição 3, e em alguns casos, na posição 7. Os glicosídeos mais encontrados são glicose, galactose, ramnose e frutose.

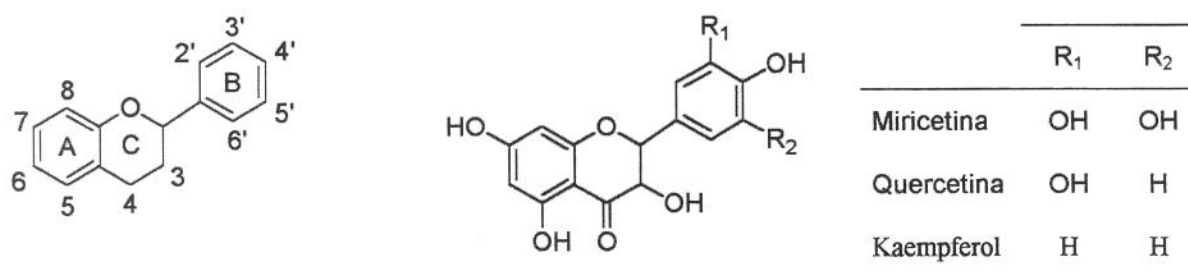


Fig. 1. Estrutura básica de flavonóides e de flavonóis agliconas presentes em chás.

O chá, uma das bebidas mais consumidas no mundo, é uma das fontes mais ricas em flavonóides. Produzidos a partir de folhas de *Camellia sinensis*, os chás verde e preto são largamente consumidos em países orientais e ocidentais, respectivamente. O chá verde é constituído de folhas secas colhidas de diferentes partes da planta, o que determina os

vários tipos de chás disponíveis. Já o chá preto passa por diversas etapas de processamento, dentre elas a de “fermentação”, que consiste, na verdade, de uma oxidação enzimática dos flavanóis a teaflavinas, que constituem um grupo característico deste tipo de chá. No Brasil, o chá mate é a infusão mais consumida, seguida do chá preto e de outros tipos, como por exemplo, os de frutas (maçã e morango) e ervas (erva doce, erva cidreira, camomila, hortelã, boldo). Muitos dos chás de ervas são consumidos para fins medicinais segundo a sabedoria popular. Em alguns estados brasileiros, a erva-mate é bastante consumida como chimarrão ou tererê, diferindo pela forma de preparo, como a temperatura da água de infusão.

Os altos teores de flavonóides presentes em chás fazem deles alimentos funcionais. Os estudos sobre o potencial efeito benéfico dos flavonóides para a saúde humana são ainda inconsistentes ou insuficientes, apesar dos numerosos artigos de revisão publicados (Cook & Samman, 1996; Dufresne & Farnworth, 2000; Hertog, 1996; Hollman & Katan, 1997 e 1999; Kinlen, Willows, Goldblatt & Yudkin, 1988; Geleijnse, Launer, Hofman, Pols & Witteman, 1999; Schramm & German, 1998; Visioli, Borsani & Galli, 2000; Wang, Provan & Helliwell, 2000). Embora muitos dos trabalhos envolveram os chás verde e preto, e não substâncias específicas, os efeitos benéficos são geralmente atribuídos às catequinas e teaflavinas. Além das catequinas e teaflavinas, os chás também contêm flavonóis como miricetina, quercetina e kaempferol.

Estudos *in vitro* realizados por Rodgers e Grant (1998) mostraram que os flavonóis (miricetina e quercetina) diminuíram o crescimento de células cancerosas de mama humana. Miricetina, quercetina e kaempferol inibiram tumores em ratos (Mukhtar, Das, Khan, Wang, Bik & Bickers, 1988; Verma, Johnson, Gould & Tanner, 1988). Por outro

lado, Pamukcu, Yalçiner, Hatcher e Bryan (1980) observaram em seu estudo, que a quercetina é carcinogênica para o epitélio do intestino e bexiga de ratos. No estudo epidemiológico de Hertog *et al.* (1995), não houve relação entre consumo de flavonóis e flavonas com mortalidade por câncer de pulmões e colo-retal, mas correlação direta com mortalidade por câncer de estômago. Para a continuação dos estudos, é imprescindível a disponibilidade de dados confiáveis sobre os teores destes flavonóides em chás.

No presente trabalho, os flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol foram quantificados, na forma de agliconas, em chás comercializados no Brasil, dentre eles, chás verde, preto, mate, infusões de frutas e de outras ervas. A determinação na forma de agliconas simplifica a análise. Além disso, esta é, provavelmente, a forma na qual os flavonóis são absorvidos no organismo humano (Merken & Beecher, 2000).

2. Material e métodos

2.1. Amostras

Diversas marcas de chás verde (*Camellia sinensis*), preto (*Camellia sinensis*), erva doce (*Foeniculum vulgare*), camomila (*Matricaria* sp), erva cidreira (*Cymbopogon citratus*), hortelã (*Mentha* sp), boldo (*Peumus boldus*), morango (*Fragaria* sp), maçã (*Pyrus malus*), mate (*Ilex paraguariensis*) e erva mate (*Ilex paraguariensis*) foram compradas no mercado local (Campinas, SP). O produto “Ban-chá” é um chá verde constituído de folhas mais velhas e rasteiras das plantas de *Camellia sinensis*. O chá verde propriamente dito é feito de folhas mais novas e tenras. A diferença da matéria-prima

reflete-se no sabor, cor e, possivelmente, nos teores de flavonóides. De todos os produtos analisados, apenas uma marca de chá verde e uma de camomila têm matéria-prima importada (Alemanha e Argentina, respectivamente), ambas marcas sendo embaladas no Brasil. As embalagens variaram de 9 a 1000 g; a diferença deve-se ao fato de que as ervas mate, o ban-chá e uma das marcas de chá verde foram comercializadas a granel. As demais marcas foram adquiridas em sachês. Para cada marca, três lotes foram analisados em duplicatas.

2.2. Padrões e reagentes

Os padrões de quercetina, miricetina e kaempferol utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Soluções-estoque foram preparadas com metanol, em concentrações em torno de 1 mg/mL, armazenadas a -20°C por no máximo 2 meses. Para a preparação de soluções-trabalho, pequenos volumes de solução-estoque tiveram o metanol evaporado por fluxo de nitrogênio e os flavonóis redissolvidos em solução aquosa de metanol 50%. Em testes preliminares, os padrões injetados em metanol puro apresentaram caudas. Por outro lado, os padrões dissolvidos em água pura apresentaram baixa estabilidade. Por isso, os padrões foram estocados em metanol e a substituição por metanol aquoso foi realizada imediatamente antes da injeção.

Metanol, HCl e ácido fórmico, todos grau analítico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha), e o butil-hidroxianisol, da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). O metanol grau CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foi adquirido da Mallinckrodt (Kentucky, EUA).

2.3. Preparação de amostras e hidrólise

As folhas do mesmo lote foram misturadas e pesadas. Para manter a presença da embalagem durante a extração mesmo depois de pesadas, as folhas foram reembaladas em sachês cedidos pela Der Teeladen (São Paulo, SP) e fechadas por termossoldagem de uma fita de polietileno de baixa densidade. Os novos sachês, assim como as folhas preparadas a granel, com peso de 5g foram colocadas em 500 mL de água destilada fervente e deixadas por 5 min (Hertog, Hollman & van de Putte, 1993), com ligeiras agitações no início, meio e final do período. Em seguida, a infusão foi filtrada a vácuo em papel de filtro no caso de folhas a granel, ou o sachê removido da infusão, sendo então resfriadas à temperatura ambiente. O volume foi elevado a 500 mL com água destilada. A fim de melhor padronizar a extração, ao final do tempo de infusão, as embalagens foram retiradas e imersas em aproximadamente 85 mL de água fria e agitadas, sendo esta água posteriormente utilizada para completar o volume de 500 mL para o qual foram elevados os extratos. O mesmo foi realizado com as amostras filtradas.

Para a hidrólise dos flavonóis (Hertog *et al.*, 1993), 15 mL destes extratos foram adicionados de 40 mL de metanol aquoso 62,5% (com 2 g/L butil-hidroxianisol) e, a esta mistura, 10 mL HCl 6M. Este meio de reação resultou em 1,2M HCl em metanol aquoso 50% (v/v). A hidrólise procedeu em banho com refluxo a 90°C por 2 horas. Após este período, o extrato foi resfriado em banho de gelo e, em balão de 100 mL, elevado seu volume com metanol. Aproximadamente 2 mL do hidrolisado foi filtrado em filtro de politetrafluoretileno 0,22 µm hidrofóbico (Millipore, EUA) para posterior injeção.

2.4. Cromatografia

A determinação dos flavonóis foi realizada por CLAE. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa Novapak C₁₈ (3,9 x 150 mm, 4µm) (Waters, Milford, MA). O equipamento foi um cromatógrafo líquido Waters, constituído de bomba quaternária modelo 600, detector de arranjo de diodos modelo 996, injetor manual Rheodyne, controlado pelo software Millennium 32.

A eluição em gradiente teve como fase móvel solvente A, água/ácido fórmico (99,7:0,3, v/v) e solvente B, metanol/ácido fórmico (99,7:0,3, v/v). A programação foi a seguinte: de 70 a 50%A em 10 min e de 50 a 30%A em 20 min, sempre em gradiente linear. O fluxo foi de 1,0 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 20 µL. A identificação dos componentes baseou-se nos espectros obtidos entre 210 e 600 nm (Anexo I) e nos tempos de retenção, comparados com os de padrões injetados diariamente. Os flavonóis agliconas foram quantificados a 370 nm.

2.5. Curva padrão

Curvas padrão de cinco pontos foram construídas para quantificação dos flavonóis em concentrações baseadas nas estimativas dos seus teores nos chás. De uma solução-mãe em metanol, contendo uma mistura dos padrões em proporção relativa semelhante a das amostras, volumes de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram retirados para balões de 5 mL. O solvente foi evaporado, os flavonóis redissolvidos em metanol aquoso 50% e o volume elevado a 5 mL. Cada solução constituía um ponto, o qual era injetado em triplicata.

3. Resultados e discussão

3.1. Características da curva padrão

As curvas padrão passaram pela origem (Anexo II) e apresentaram-se lineares nas faixas de concentração que cobriram as das amostras. A Tabela 1 mostra os dados obtidos de cada curva.

Tabela 1: Propriedades das curvas padrão de flavonóis

Flavonol	Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Coefficiente de correlação	Coefficiente de variação entre triplicatas (%)*
Miricetina	1,8 – 9,1	0,9885	2,5
Quercetina	11,4 – 56,8	0,9944	1,7
Kaempferol	8,9 – 44,4	0,9972	1,8

* Médias de 15 valores

Os coeficientes de correlação foram bons para quercetina e kaempferol, ambos maiores que 0,99. Para miricetina, observa-se que o coeficiente de correlação foi mais baixo. Isto ocorreu porque sua concentração é bem menor que a dos outros flavonóis. Os coeficientes de variação entre as triplicatas de cada ponto foram, em média, de 1,7 a 2,5, com a miricetina apresentando a maior variação também pela sua concentração bem menor.

3.2. Repetitividade

Para avaliar a precisão intralaboratorial do método como um todo, foram realizados testes de repetitividade com as amostras de chás verde e preto. Duplicatas de uma mesma embalagem foram analisadas para cada marca de produto. Os coeficientes de variação (CV) entre duplicatas de chás verdes foram os seguintes: miricetina, 3,0%; quercetina, 4,1%; para kaempferol, 1,9% (médias de seis amostras). Em chás pretos, os CVs foram: miricetina,

3,3% (média de quatro amostras); quercetina, 4,4%; kaempferol, de 2,5% (médias de oito amostras para quercetina e kaempferol). Duas marcas de chá preto continham miricetina em quantidades menores que 0,5 mg/g de folhas, o que resultou em CV de 20%. Deste resultado, observou-se que para a miricetina nestas amostras, o limite de quantificação foi em torno de 0,5 mg/g de folhas, equivalente à injeção de 15 ng de miricetina.

3.3. Teores de flavonóis agliconas em chás verde e preto

A Fig. 2 mostra cromatogramas típicos de flavonóis em chás verde e preto.

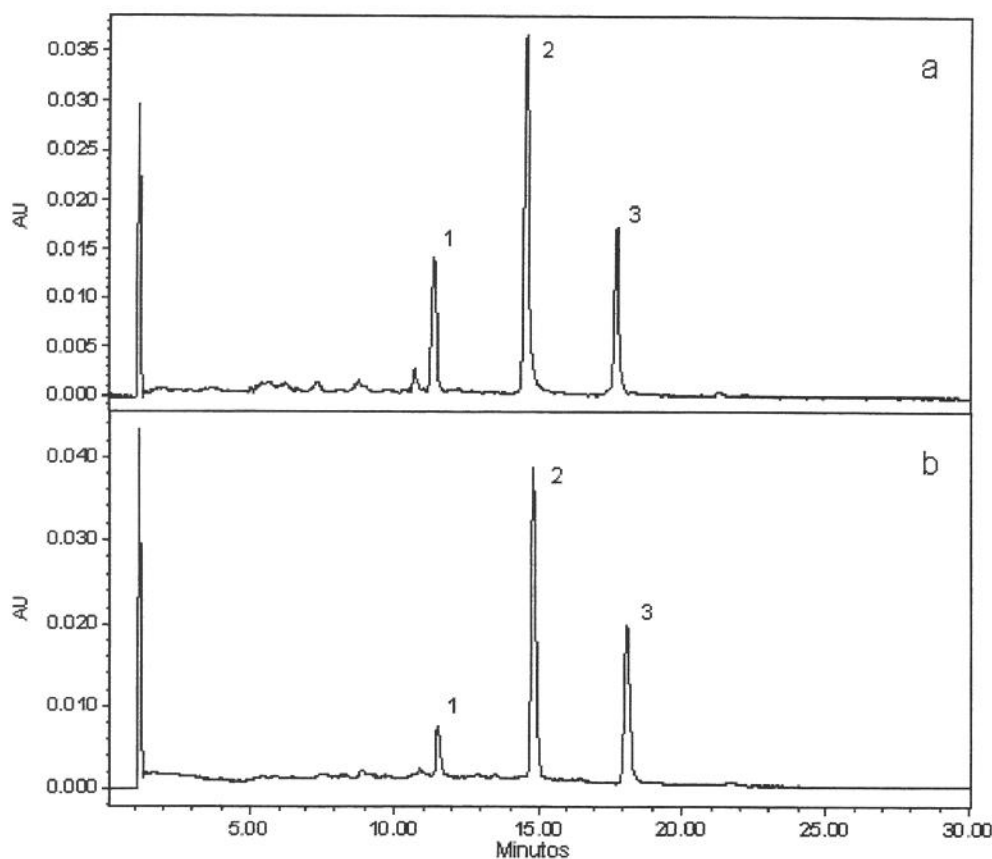


Fig. 2. Cromatogramas típicos dos flavonóis de chás: verde (A) e preto (B). Condições cromatográficas: 70 a 50%A em 10 min e de 50 a 30%A em 20 min, sendo A: H₂O/ác. fórmico (99.7:0.3, v/v) e B: MeOH/ác. fórmico (99.7:0.3, v/v), fluxo 1,0 mL/min. Picos: miricetina (1) quercetina (2) e kaempferol (3).

A Tabela 2 mostra os teores de flavonóis agliconas em chás verde e preto encontrados no comércio de Campinas. Em todas as amostras, a quercetina predominou, seguida por kaempferol, com exceção de uma amostra, na qual o teor de kaempferol e quercetina foram iguais. Observa-se variação dos flavonóis entre os tipos de chás, e mesmo entre marcas do mesmo tipo. A miricetina é o componente com teores mais variados. Enquanto em chás pretos sua concentração variou entre traços e 0,7 mg/g de folha, em chás verdes varia entre 0,7 e 1,9 mg/g de folhas. A quantidade menor em chás pretos pode ser decorrente do processamento, pois as folhas para chá preto sofrem um tratamento térmico mais drástico e a miricetina já se mostrou o flavonol menos estável dentre os estudados. A amostra ban-chá e o chá verde marca A são do mesmo fabricante. Os teores menores encontrados no ban-chá reforçam a idéia de que as folhas mais tenras, que constituem o chá verde, apresentam melhor qualidade não apenas sensorial, mas também quanto à presença de flavonóides. Outra característica é a homogeneidade da amostra: no ban-chá, além de folhas mais velhas, há grande presença de galhos, o que resulta em menor homogeneidade que o chá verde, onde há apenas folhas.

Tabela 2: Teores de flavonóis agliconas em chás verde e preto*

Amostra	Marca	Miricetina		Quercetina		Kaempferol	
		mg/g folha	µg/mL extrato	mg/g folha	µg/mL extrato	mg/g folha	µg/mL extrato
Ban-chá	A	1,1±0,1	1,6±0,1	2,5±0,1	3,8±0,2	1,0±0,1	1,5±0,1
Chá verde	A	1,9±0,1	2,8±0,1	3,4±0,1	5,2±0,1	1,9±0,1	2,8±0,1
	B	0,7±0,1	1,0±0,1	2,5±0,1	3,7±0,1	1,1±0,1	1,6±0,1
Chá preto	A	traço**	traço	3,1±0,2	4,7±0,3	1,6±0,1	2,4±0,1
	B	traço	traço	2,7±0,5	4,0±0,7	2,0±0,1	3,0±0,2
	C	0,5±0,2	0,7±0,2	3,2±0,1	4,7±0,2	1,8±0,2	2,7±0,3
	D	0,7±0,1	1,1±0,1	3,2±0,2	4,8±0,3	2,0±0,1	3,0±0,2

*médias e desvios padrão de 3 lotes diferentes analisados em duplicatas

**aproximadamente 0,3 mg/g de folha, o limite de quantificação do método foi de 0,5 mg/g de folha

A matéria-prima do chá verde marca B foi importada da Alemanha, sendo as demais amostras de produção brasileira. Ban-chá e chá verde marca A estavam a granel e as demais amostras, em sachês.

Toyoda, Tanaka, Hoshino, Akiyama, Tanimua e Saito (1997) quantificaram os mesmos flavonóis em diversos tipos de chás, encontrando, para chá verde teores em mg/g de folha de 1,3 para miricetina, 1,6 para quercetina e 1,5 para kaempferol. Com exceção de quercetina, para o qual os teores relatados são superiores no presente estudo (2,5-3,4 mg/g folha), os valores para miricetina e kaempferol são concordantes. No trabalho de Hertog *et al.* (1993), em diferentes marcas de chás pretos, os teores, em µg/mL de extrato variaram entre 1,7 e 5,2 para miricetina, 10 e 25 para quercetina, entre 6 e 17 para kaempferol. Estes valores são superiores os obtidos no presente trabalho. Em chás verdes, as faixas foram de 5,2 a 12, 14 a 23 e 9 a 15 µg/mL de extrato para miricetina, quercetina e kaempferol, respectivamente, teores também maiores que os encontrados nos chás verdes disponíveis no

Brasil. Os conteúdos de quercetina e de kaempferol em chá preto analisado por Karakaya e El (1999) são muito maiores aos encontrados nas amostras brasileiras (35 e 110 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

3.4. Estudo de flavonóis agliconas em outros chás comercializados no Brasil

Como já ressaltado, o consumo de chás tradicionalmente consumidos e estudados na Ásia e Europa (verde e preto, respectivamente) não é expressivo no Brasil. A posição destacada do chá mate é indiscutível, sendo outros tipos de chás, como de frutas e ervas, merecedores de atenção. Para se conhecer a composição destes chás em termos de flavonóis agliconas, aplicou-se a mesma metodologia usada para chás verde e preto. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos. A Fig. 3 mostra os cromatogramas das infusões hidrolisadas nas quais foram encontrados flavonóis agliconas.

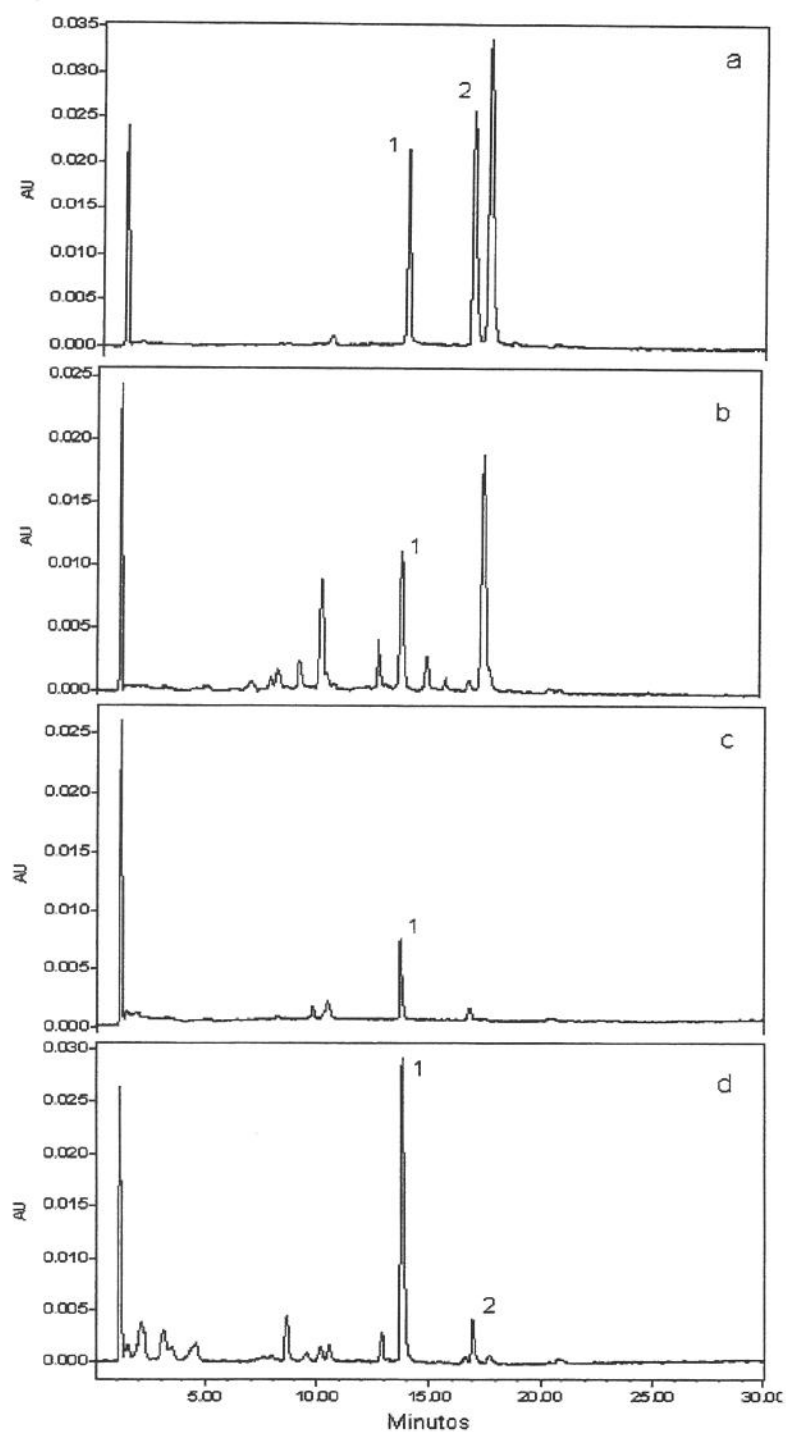


Fig. 3. Cromatogramas de amostras de chás: (a)camomila, (b)boldo, (c)morango e (d)erva mate. Condições cromatográficas: 70 a 50%A em 10 min e de 50 a 30%A em 20 min, sendo A: H₂O/ác. fórmico (99,7:0,3, v/v) e B: MeOH/ác. fórmico (99,7:0,3, v/v), fluxo 1,0 mL/min. Picos: quercetina (1) e kaempferol (2).

Tabela 3: Teores de flavonóis em chás comercializados no Brasil

Amostras		Concentração (mg/g de folhas)*			
		Marca	M	Q	K
Erva doce	<i>Foeniculum vulgare</i>	A	nd	nd	nd
Camomila	<i>Matricaria sp</i>	A	nd	0,9±0,1	nd
		B	nd	0,7±0,1	nd
		C	nd	0,6±0,1	nd
Erva cidreira	<i>Cymbopogon citratus</i>	A	nd	nd	nd
Hortelã	<i>Mentha sp</i>	A	nd	nd	nd
Boldo	<i>Peumus boldus</i>	A	nd	1,6±0,3	2,5±0,5
		B	nd	2,0±0,1	2,0±0,2
		C	nd	2,0±0,1	2,6±0,3
Morango	<i>Fragaria sp</i>	A	nd	0,4±0,1	nd
Maçã	<i>Pyrus malus</i>	A	nd	nd	nd
Mate	<i>Ilex paraguariensis</i>	A	nd	nd	nd
Erva mate	<i>Ilex paraguariensis</i>	A	nd	2,5±0,1	0,4±0,1
		B	nd	2,0±0,3	0,3±0,1
		C	nd	3,3±0,3	0,6±0,1

Não detectado (nd)

*média e desvio padrão de 3 lotes diferentes

A matéria-prima para a camomila marca A foi importada da Argentina. Com exceção da erva-mate, que estava a granel, as demais amostras estavam em sachês.

Nas folhas de camomila analisadas, foi encontrada quantidade razoável de quercetina, embora cerca de 3 vezes menor que os teores presentes em chás verde e preto. Em boldo, observou-se quantidade um pouco superior de quercetina, muito embora o que chama a atenção é o teor de kaempferol, que foi maior, dentre os chás analisados neste trabalho. Em morango desidratado para infusão, para o qual foi analisada apenas a única marca encontrada no mercado, a quercetina foi o único flavonol presente e em quantidade bem reduzida. Por fim, na erva mate, a quercetina teve valor comparável ao dos chás verde

e preto, embora o kaempferol esteja em baixos teores. Curiosamente, nenhum flavonol foi encontrado no chá mate, apesar deste ser proveniente de mesma fonte que a erva mate. Uma explicação possível seria o efeito do processamento sobre cada um dos produtos, atribuindo-lhes características distintas. A torragem das folhas para obtenção do chá mate poderia ter degradado os flavonóis.

4. Conclusão

Os teores de flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol encontrados em chás verde e preto comercializados no Brasil são comparáveis aos resultados encontrados na literatura. Miricetina não foi encontrada em nenhuma das amostras de chás de frutas, de flores e de ervas consumidos no Brasil, enquanto que a quercetina foi observada em quatro amostras em uma faixa menor (camomila, boldo e morango) que a de chás verde e preto, com exceção da erva mate, que estava com valores semelhantes. Duas amostras (boldo e erva mate) apresentaram kaempferol, no boldo em concentração igual ou maior que as de chás verde e preto. Desta constatação, conclui-se que estes chás são fontes de flavonóis na dieta brasileira, embora com teores menos significativos que em chás verde e preto.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa à primeira autora.

Referências bibliográficas

Cook, N.C. & Samman, S. (1996). Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, **7**, 66-76.

Dufresne, C & Farnworth, E. (2000). Tea, kombucha, and health: a review. *Food Research International*, **33**, 409-421.

Geleijse, J.M.; Launer, L.J.; Hofman, A.; Pols, H.A.P. & Witteman, J.C.M. (1999) The flavonoids may protect against atherosclerosis. *Archives of Internal Medicine*, **159**, 2170-2174.

Hertog, M.G.L. (1996). Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceedings of the Nutrition Society*, **55**, 385-397.

Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H. & van de Putte, B. (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1242-1246.

Hertog, M.G.L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Archives of Internal Medicine*, **155**, 381-386.

Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **51**, 305-310.

Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 937-942.

Karakaya, S. & El, S.N. (1999) Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chemistry*, **66**, 289-292.

Kinlen, L.J.; Willows, A.N.; Goldblatt, P. & Yudkin, J. (1988). Tea consumption and cancer. *British Journal of Cancer*, **58**, 397-401.

Merken, H. M. & Beecher, G.R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, **897**, 177-184.

Mukhtar, H.; Das, M.; Khan, W.A.; Wang, Z.Y.; Bik, D.P. & Bickers, D.R. (1988). Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-, benzo[a]pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Research*, **48**, 2361-2365.

Pamukcu, A.M.; Yalçiner, S.; Hatcher, J.F. & Bryan, G.T. (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research*, **40**, 3468-3472.

Rodgers, E.H. & Grant, M.H. (1998). The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, **116**, 213-228.

Schramm, D.D. & German, J.B. (1998). Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **9**, 560-566.

Toyoda, M.; Tanaka, K.; Hoshino, K.; Akiyama, H.; Tanimura, A. & Saito, Y. (1997). Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 2561-2564.

Verma, A.K.; Johnson, J.A.; Gould, M.N. & Tanner, M.A. (1988). Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Research*, **48**, 5754-5758.

Visioli, F.; Borsani, L. & Galli, C. (2000). Diet and coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research*, **47**, 419-425.

Wang, H.; Provan, G.J. & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science and Technology*, **11**, 152-160.

Capítulo 3

Quantificação simultânea de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil

(Artigo a ser enviado ao Journal of Agricultural and Food Chemistry)

Quantificação simultânea de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil

Simara Matsubara & Delia B. Rodriguez-Amaya*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, Campinas, SP, Brasil, CEP 13083-970

RESUMO

No presente trabalho, foram determinados os teores de catequinas e teaflavinas em três marcas de chá verde e quatro de chá preto comercializadas no Brasil. A metodologia analítica consistiu de extração aquosa bastante simples e cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Novapak C₁₈ (3,9 x 150 mm, 4µm) com um gradiente de água e metanol ambos em ácido fórmico como fase móvel. Em chás verdes, os teores de catequinas (mg/g de folha) variaram substancialmente: catequina, 0,8 a 2,8; epigallocatequina, 8 a 44; epigallocatequinagalato, 11 a 50; epicatequina, de 2,3 a 8,5 e epicatequinagalato, 3,1 a 7,3. No caso dos chás pretos, as concentrações (mg/g de folha) de catequinas estiveram nas faixas de: 10 a 50 de epigallocatequina, 14 a 37 de epigallocatequinagalato, 5 a 9 de epicatequina e de 10 a 21 de epicatequinagalato. As teaflavinas apresentaram variação menor: entre 5 (teaflavina 3'-galato) e 13 mg/g de folha (teaflavina 3-3'-digalato). Amostras de chás muito consumidas no Brasil (erva doce, camomila, erva cidreira, hortelã, boldo, mate, erva mate, maçã e morango) também foram investigadas, não sendo encontrada nenhuma catequina ou teaflavina.

Palavras-chave: chá verde, chá preto, catequinas, teaflavinas.

INTRODUÇÃO

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo todo. Anteriormente seu consumo concentrava-se em países da Ásia e Europa, panorama que vem mudando ao longo dos últimos anos. O crescente interesse pela bebida deve-se grandemente a estudos que a mostram como fonte de flavonóides e a relação inversa entre seu consumo e o risco de doenças degenerativas como câncer e doenças do coração. Diversos artigos de revisão (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) mostram o grande número de trabalhos abordando o assunto, embora as evidências sejam consideradas ainda inconclusivas. O impacto que a ingestão excessiva de flavonóides gera sobre a saúde foi também revisado (8), abordando principalmente a ação dos suplementos alimentares.

Estudos *in vitro* estão em estado avançado, mostrando ação em todos os estágios da carcinogênese (9). Vários destes trabalhos utilizaram extratos de chás mas atribuíram o efeito protetor às catequinas e teaflavinas. Utilizando catequinas isoladas de seus extratos, Ho *et al.* (10) mostraram em seu estudo, a atividade antioxidante de epigallocatequina galato e Nishida *et al.* (11), a inibição do crescimento e secreção de α -fetoproteína por hepatomas humanos também sob ação de epigallocatequina galato. A epicatequina aumentou a atividade da NADPH citocromo *c* redutase de células cancerosas de pulmões (12).

Em ratos, os estudos com epigallocatequina galato são predominantes, possivelmente pelo seu teor maior dentre as catequinas em chá verde. Este composto impediu o crescimento de tumores de fígado (11) e intestino (13).

As catequinas pertencem a um grupo de polifenóis encontrados nas folhas de *Camellia sinensis*, matéria-prima para a produção de chás verde e preto. O chá verde é uma infusão de folhas apenas secas, enquanto que o chá preto provém de folhas processadas. No processamento, as folhas são oxidadas e secas, sendo a primeira etapa, a mais importante para o desenvolvimento de cor e sabor da bebida. A oxidação é enzimática por ação da polifenoloxidase presente nos vacúolos das células. Para a enzima ser liberada destes vacúolos, as folhas são trituradas e deixadas expostas ao oxigênio do ar (14). Anteriormente, acreditava-se que o processo era fermentativo e por este motivo, é ainda conhecido como “fermentação” para a produção do chá preto.

As catequinas são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (15). As teaflavinas são compostos responsáveis por parte da cor (alaranjada) e sabor (adstringência) da infusão (16) de chá preto. As estruturas destes dois grupos de compostos estão representadas na Figura 1.

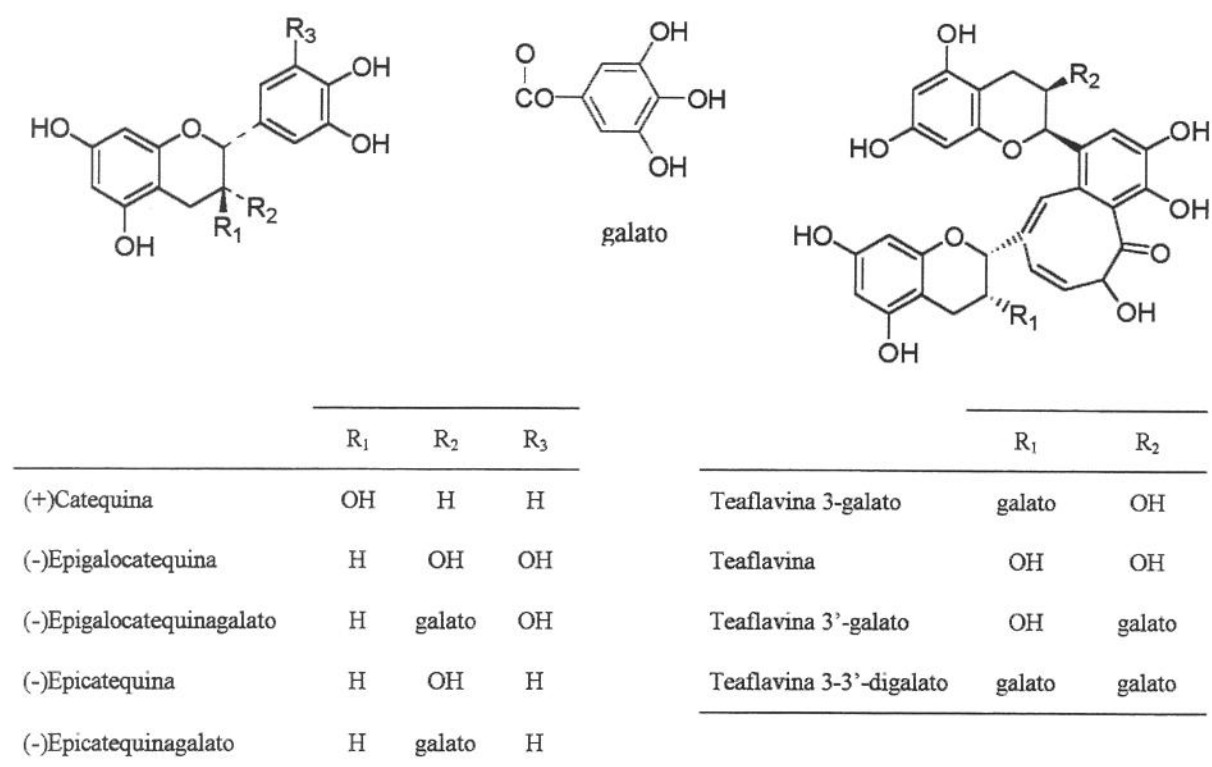


Figura 1. Estruturas das catequinas e teaflavinas

No presente trabalho foram determinados os teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Duas marcas de chá verde (*Camellia sinensis*), e quatro de chá preto (*Camellia sinensis*), assim como diversas marcas de erva doce (*Foeniculum vulgare*), camomila (*Matricaria* sp), erva cidreira (*Cymbopogon citratus*), hortelã (*Mentha* sp), boldo (*Peumus boldus*), morango (*Fragaria* sp), maçã (*Pyrus malus*), mate (*Ilex paraguariensis*)

e erva mate (*Ilex paraguariensis*) foram compradas no mercado local (Campinas, SP). Um chá verde constituído de folhas mais velhas e rasteiras das plantas de *Camellia sinensis*, denominado “Ban-chá”, muito conhecido e apreciado entre a comunidade oriental foi também analisado. O chá verde propriamente dito é feito de folhas mais novas e tenras. A diferença da matéria-prima reflete-se no sabor, cor e, possivelmente, nos teores de catequinas. De todos os produtos analisados, apenas uma marca de chá verde e uma de camomila têm matéria-prima importada (Alemanha e Argentina, respectivamente). As embalagens variaram de 9 a 1000 g; a diferença deve-se ao fato de que as ervas mate, o ban-chá e uma das marcas de chá verde foram vendidas a granel. As demais marcas foram adquiridas em sachês. Para cada marca, três lotes foram analisados em duplicatas.

Padrões e reagentes. Os padrões de (+)catequina, (-)epigallocatequina, (-)epigallocatequinagalato, (-)epicatequina, (-)epicatequinagalato e teaflavinas utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). As teaflavinas estavam disponíveis na forma de mistura das quatro teaflavinas (teaflavina, teaflavina 3-galato, teaflavina 3'-galato e teaflavina 3-3'-digalato), denominada de “extrato de chá”. Soluções-estoque foram preparadas com metanol, em concentrações em torno de 1 mg/mL, armazenadas a -20°C por no máximo 2 meses. Para a preparação de soluções-trabalho, pequenos volumes de soluções-estoque tiveram o metanol evaporado por fluxo de nitrogênio e os padrões redissolvidos em solução aquosa de metanol 50%.

Para cromatografia, utilizou-se água deionizada (18,2 mΩ), metanol grau CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) adquirido da Mallinckrodt (Kentucky, EUA) e ácido fórmico, grau analítico, da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Preparação de amostras. As folhas do mesmo lote foram misturadas e pesadas. Para manter a presença da embalagem durante a extração mesmo depois de pesadas, as folhas foram reembaladas em sachets cedidos pela Der Teeladen (São Paulo, SP) e fechadas por termossoldagem de uma fita de polietileno de baixa densidade. Os novos sachês, assim como as folhas preparadas a granel, com massa de 5g foram colocadas em 500 mL água destilada fervente e deixadas por 5 min (17), com ligeiras agitações no início, meio e final do período. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro no caso de folhas a granel, ou o sachê removido da infusão e por fim, a infusão foi resfriada em temperatura ambiente. O volume foi então elevado a 500 mL com água destilada. A fim de melhor padronizar a extração, ao final do tempo de infusão, as embalagens foram retiradas e imersas em aproximadamente 85 mL de água fria e agitadas, sendo esta água posteriormente utilizada para completar o volume de 500 mL. O mesmo foi feito com as amostras filtradas.

Em seguida, uma alíquota de 4 mL do extrato foi retirada e seu volume completado com água destilada para 25 mL em balão volumétrico, estando esta solução final diluída por um fator de 6,25. Aproximadamente 2 mL do hidrolisado foi filtrado em filtro de politetrafluoretileno 0,22 µm hidrofóbico (Millipore, EUA) para posterior injeção.

Cromatografia. A determinação das catequinas e teaflavinas foi realizada por CLAE. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa Novapak C₁₈ (3,9 x 150 mm, 4µm) (Waters, Milford, MA). O equipamento foi um cromatógrafo líquido Waters, constituído de bomba quaternária modelo 600, detector de arranjo de diodos modelo 996, injetor manual Rheodyne, controlado pelo software Millennium 32.

A eluição em gradiente teve, como fase móvel solvente A, água/ácido fórmico (99,7:0,3, v/v) e solvente B, metanol/ácido fórmico (99,7:0,3, v/v). A programação foi a seguinte: 90%A por 6 min, de 90 a 70%A em 14 min e de 70 a 55%A em 20 min, sempre em gradiente linear. O fluxo foi de 1,0 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 10 µL. A identificação dos componentes baseou-se nos espectros obtidos entre 210 e 600 nm (Anexos III e IV) e nos tempos de retenção comparados com misturas de padrões injetadas diariamente. As catequinas e teaflavinas foram quantificadas a 280 nm e curvas de calibração foram construídas obtendo-se faixas lineares para as catequinas em concentrações entre 0,6 e 205 µg/mL, e para as teaflavinas, entre 3 e 40 µg/mL.

Inicialmente, pensou-se em determinar os flavonóis, catequinas e teaflavinas simultaneamente. Embora a separação cromatográfica destes três grupos tenha sido conseguida, esta tentativa foi abandonada, pois a hidrólise requerida para os flavonóis degradava as catequinas.

Curva padrão. As curvas padrão para quantificação de catequinas e teaflavinas foram construídas com concentrações baseadas nas estimativas dos seus teores em chás. De uma solução-mãe em metanol contendo a mistura dos padrões, volumes de 1, 2, 3, 4 e 5 mL

foram retirados para balões de 5 mL, o solvente foi evaporado e as catequinas e teaflavinas redissolvidas em metanol aquoso 50%. Cada solução constituía um ponto, o qual era injetado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características da curva padrão. As curvas padrão passaram pela origem e apresentaram-se lineares nas faixas de concentração em que se encontraram as amostras (Anexos V e VI). A Tabela 1 mostra os dados obtidos de cada curva.

Tabela 1. Propriedades das curvas padrão

	Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Coefficiente de correlação	Coefficiente de variação entre triplicatas (%)*
(-)Catequina	0,6-3,1	0,9998	0,7
(+)Epigallocatequina	30-143	0,9963	0,8
(+)Epigallocatequinagalato	41-205	0,9985	0,5
(+)Epicatequina	13-66	1,0000	0,3
(+)Epicatequinagalato	5-25	0,9994	1,2
Teaflavina 3-galato	5-25	0,9944	1,8
Teaflavina	3-14	0,9902	1,6
Teaflavina 3'-galato	4-20	0,9845	1,4
Teaflavina 3-3'-digalato	8-40	0,9957	1,6

* Médias de 15 valores

Os coeficientes de correlação foram muito bons, com valores superiores a 0,99. Para teaflavina 3'-galato, observa-se que o coeficiente de correlação é menor que os demais,

embora a variação entre as triplicatas tenha permanecido menor que 2%, assim como para os demais compostos.

Teores de catequinas. As concentrações de catequinas em chás verde e preto estão apresentados na Tabela 2 e os cromatogramas de catequinas, na Figura 2. A variação nos níveis de catequinas foi tão marcante que não houve um cromatograma típico para chá verde.

Tabela 2. Teores de catequinas e teaflavinas em chás verde e preto.

		Concentração*								
Amostra	Marca	C**	EGC	EGCG	EC	ECG	TF1	TF2	TF3	TF4
Em mg/g folha										
Ban-chá	A	1,8±0,2	8±4	11±3	2,3±0,4	3,1±0,5	nd	nd	nd	nd
Chá verde	A	2,8±0,3	44±2	50±4	8,5±0,3	7,3±0,6	nd	nd	nd	nd
	B	0,8±0,3	23±5	26±2	4,4±0,8	4,6±0,4	nd	nd	nd	nd
Chá preto	A	nd	17±5	14±4	5,0±0,1	10±4	10±3	8,0±2,0	5,0±2,0	10±3
	B	nd	10±5	14±8	5,0±0,2	10±7	9,0±2,0	10±2	4,4±0,8	8,0±2,0
	C	nd	28±15	28±5	7,0±0,2	21±3	13±1	11±2	6,6±0,6	13±2
	D	nd	50±2	37±3	8,7±0,7	17±2	11±1	12±1	7,4±0,3	10±1
Em µg/mL extrato										
Ban-chá	A	2,8±0,3	12±6	18±5	3,7±0,6	5,0±0,8	nd	nd	nd	nd
Chá verde	A	4,5±0,4	72±3	80±6	13,7±0,4	12±1	nd	nd	nd	nd
	B	1,3±0,4	37±6	41±3	7,0±1,0	7,3±0,5	nd	nd	nd	nd
Chá preto	A	nd	27±8	22±7	8,0±2,0	17±6	16±5	14±4	8,0±3,0	15±5
	B	nd	16±8	23±10	8,0±3,0	16±10	14±3	15±2	7,0±1,0	13±3
	C	nd	45±24	45±8	11±4	34±4	20±1	17±3	11±1	21±3
	D	nd	81±4	60±5	14±1	28±3	18±1	19±1	12±1	17±1

Não detectado (nd)

*média e desvio padrão de três lotes analisados em duplicata.

** (C) catequina; (EGC) epigallocatequina; (EGCG) epigallocatequinagalato; (EC) epicatequina; (ECG) epicatequinagalato; (TF1) teaflavina 3-galato; (TF2) teaflavina; (TF3) teaflavina 3'-galato; (TF4) teaflavina 3-3'-digalato.

A matéria-prima do chá verde marca B foi importada da Alemanha, sendo as demais amostras de produção brasileira. Ban-chá e chá verde marca A estavam a granel e as demais amostras, em sachês.

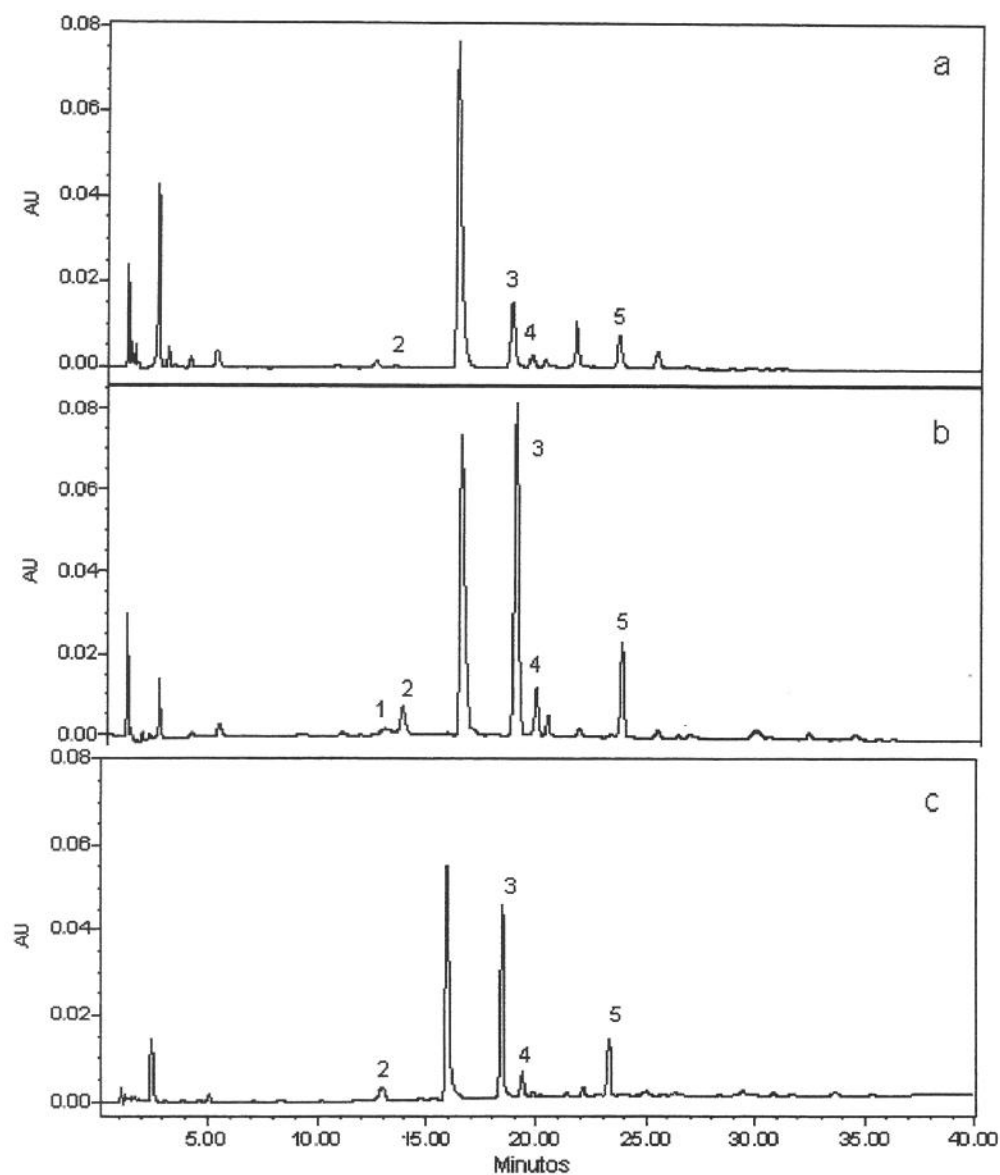


Figura 2. Cromatogramas de amostras de chá verde: Ban-chá (a), chá verde marca A (b) e chá verde marca B (c). Condições cromatográficas: Gradiente linear: 90%A/6 min, de 90 a 70%A/14 min, de 70 a 55%A/20 min, sendo A: H₂O/ác. fórmico (99.7:0.3, v/v) e B: MeOH/ác. fórmico (99.7:0.3, v/v) ; fluxo 1,0 mL/min; detecção a 280 nm. Picos (1) catequina, (2) epigallocatequina, (3) epigallocatequinagalato, (4) epicatequina e (5) epicatequinagalato.

Uma grande dificuldade na quantificação de catequinas é a absorvidade bem maior dos galatos, absorção mais intensa da EGCG em relação à da EGC e da ECG em relação à da EC, embora a única diferença na estrutura seja a presença dos galatos. Assim, mesmo aparecendo como um pico bem menor que a de ECG, a EGC teve concentrações maiores e requereu uma faixa de concentração maior (Tabela 1) para calibração.

Para a catequina, os valores nos chás verdes do presente trabalho, em $\mu\text{g/mL}$, estão abaixo dos resultados de Watanabe *et al.* (18) que variaram entre 11,5 e 96,4 e de Wang, Helliwell & You (19) que variaram de 6,9 a 14,1. Em mg/g , os presentes dados estão abaixo dos de Shao, Powell & Clifford (20) com faixa de 42 a 68,8, mas acima dos de Lin *et al.* (21) e de Ding, Yang & Xiao (22), com faixa de não detectado a 0,1.

A epigallocatequina teve teores dos mais altos dentre as amostras analisadas neste trabalho. Em $\mu\text{g/mL}$, estes dados são comparáveis com os de Watanabe *et al.* (18) e de Bronner & Beecher (23), com faixa de 15,9 a 40. Teores muito maiores foram encontrados por Wang *et al.* (19), entre 297 e 362 $\mu\text{g/mL}$. Em mg/g , os resultados de Shao *et al.* (20) e de Dalluge *et al.* (24) estão dentro da faixa encontrada nas amostras comercializadas no Brasil, pois variaram de 14 a 20,6 mg/g . Outros autores obtiveram valores bem menores, entre 0,1 e 3 mg/g (25, 26, 27, 28).

Para a epigallocatequinagalato, os resultados obtidos por Bronner & Beecher (23), entre 60 e 90 $\mu\text{g/mL}$ são concordantes com os do presente trabalho. Os resultados de Watanabe *et al.* (18) e de Wang *et al.* (19), variando entre 124,7 e 326 $\mu\text{g/mL}$ são muito maiores. O teor reportado por Dalluge *et al.* (24), 21,7 mg/g , está dentro da faixa de valores

para os produtos analisados neste trabalho. Entretanto, foram relatados teores maiores (20), em faixa de 65,2 a 76, e menores (21, 22, 25, 26), de 0,2 a 1,8 mg/g.

Os produtos analisados por Bronner & Beecher (23) continham epicatequina em concentrações comparáveis com os teores de chás comercializados no Brasil, estando entre 10 e 20 µg/mL. O teores determinados por Wang *et al.* (19) e Watanabe *et al.* (18) são superiores, estando em faixa de 33,5 a 64,8 µg/mL. Em mg/g, a única amostra analisada por Dalluge *et al.* (24) apresentou uma concentração de 3,8 mg/g, que está dentro da faixa das amostras do presente trabalho. O mesmo não ocorre com os teores encontrados por Shao *et al.* (20), que são maiores (20 a 26 mg/g) e de Lin *et al.* (21), Ding, Yang & Xiao (22), Price & Spitzer (26) e Goto *et al.* (25), que são menores (nd a 1,3 mg/g), com exceção de uma amostra de Lin *et al.* (21), que está na faixa coberta pelas amostras comercializadas no Brasil.

Os teores de epicatequinagalato do presente trabalho são inferiores aos apresentados por alguns autores (18, 19, 23), com faixas entre 21,6 e 50,3 µg/mL. O teor em mg/g apresentado por Dalluge *et al.* (24), é concordante (3,2 mg/g) e os de Shao *et al.* (20) são maiores (132,8 a 150,8 mg/g). Concentrações menores, entre não detectado e 1,7 mg/g, foram relatados por alguns autores (21, 22, 25, 26).

Em relação aos chás pretos, os teores de epigallocatequina dos chás brasileiros são concordantes com os de Watanabe *et al.* (18), Wang *et al.* (19) e Bronner & Beecher (23), que estão na faixa de 18,4 a 60 µg/mL, com exceção de uma amostra de Wang *et al.* (19), com menor teor (9 µg/mL). Para epigallocatequinagalato, são concordantes com valores do presente trabalho, os de Watanabe *et al.* (18), na faixa de 24,8 a 54,1 µg/mL, com ressalva

para uma amostra (9,2 µg/mL). Os demais resultados publicados ora são maiores (23) com 120 µg/mL, ora são menores (19) com faixa de 9,5 a 11,6 µg/mL. No caso da epicatequina, duas amostras de Watanabe *et al.* (18) são concordantes (10,5 e 12,6 µg/mL) e as demais, em maiores teores (20,6 a 22,7 µg/mL). O produto analisado por Bronner & Beecher (23) foi mais concentrado em epicatequina (40 µg/mL), assim como para Wang *et al.* (19), muito embora para o último houvesse uma amostra no qual a epicatequina não foi detectada. Para epicatequinagalato, há concordância dos presentes valores com as concentrações obtidas por Watanabe *et al.* (18) e Wang *et al.* (19), entre 11,9 e 33,4 µg/mL. Na amostra de Bronner & Beecher (23), a epicatequinagalato estava em nível de 110 µg/mL.

Em mg/g de folha, o chá preto foi analisado por Shao *et al.* (20) e as concentrações foram: epigallocatequina, de não detectado a 15,6; epigallocatequinagalato, de 1,6 a 10; epicatequina, de não detectado a 176 e epicatequinagalato, de não detectado a 87,2. Percebe-se que as amostras analisadas no presente trabalho têm teores menores que os relatados por este autor, com exceção de epigallocatequina, pois encontra-se na ampla faixa de concentração relatada.

Notavelmente, os teores de catequinas variaram de maneira bastante significativa entre tipos no mesmo trabalho, mostrando grande variação natural entre amostras. No entanto, a considerável diferença entre resultados de diferentes autores também reflete variação analítica, enfatizando a necessidade de aprimoramento do método e maior número de trabalhos.

Teores de teaflavinas. Observando-se o cromatograma na Figura 3, verifica-se uma sobreposição dos dois últimos picos referentes a teaflavina 3'-galato e a teaflavina 3-3'-digalato. Apesar de várias tentativas para contorno, não se obteve resultado melhor. Outros autores (20, 27, 28) publicaram seus cromatogramas em que mostram a separação das quatro teaflavinas, com o mesmo perfil alcançado no presente trabalho, embora a fase móvel empregada contenha acetonitrila. A diferença entre a separação com fase móvel contendo metanol em relação à separação com fase móvel contendo acetonitrila foi a reversão da ordem de eluição de teaflavina 3-galato e a teaflavina, a teaflavina eluída primeiro na última fase.

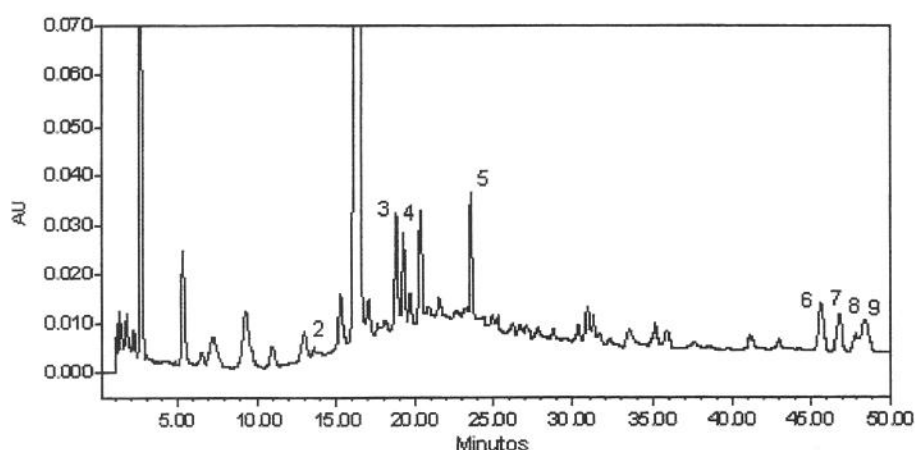


Figura 3. Cromatograma de amostra de chá preto. Condições cromatográficas: Gradiente linear: 90%A/6 min, de 90 a 70%A/14 min, de 70 a 55%A/20 min, sendo A: H₂O/ác. fórmico (99,7:0,3, v/v) e B: MeOH/ác. fórmico (99,7:0,3, v/v) ; fluxo 1,0 mL/min; detecção a 280 nm. Picos: (2) epigallocatequina, (3) epigallocatequinagalato, (4) epicatequina, (5) epicatequinagalato, (6) teaflavina 3-galato, (7) teaflavina, (8) teaflavina 3'-galato e (9) teaflavina 3-3'-digalato.

Os trabalhos em que foram determinados teores de teaflavinas são escassos. As concentrações das amostras analisadas no presente trabalho apresentam-se superiores às de

Shao *et al.* (20), que variam de 1,3 a 4,8 mg/g e ao valor de teaflavinas totais de Lee & Ong (28), de aproximadamente 1 mg/g.

Utilizando a mesma metodologia de análise e quantificação, foi verificada a presença de catequinas e teaflavinas em nove tipos de chás muito consumidos no Brasil, dentre eles, chás de ervas (erva-mate, mate, erva cidreira, erva doce, hortelã, boldo), de flores (camomila) e de frutas (morango e maçã). Em nenhuma das amostras foi encontrada alguma catequina ou teaflavina.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa à primeira autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dufresne, C; Farnworth, E. Tea, kombucha, and health: a review. *Food Res. Intern.*, **2000**, 33, 409-421.
2. Kuroda, Y.; Hara, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mut. Res./Fund. and Mol. Mechanisms of Mutagenesis*, **1999**, 436, 69-97.
3. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.*, **1997**, 2, 152-159.
4. Suganuma, M.; Okabe, S.; Sueoka, N.; Sueoka, E.; Matsuyama, S.; Imai, K.; Nakachi, K.; Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mut. Res./Rev. in Mut. Res.*, **1999**, 428, 339-344.
5. Tijburg, L.B.M.; Mattern, T.; Folts, J.D.; Weisgerber, U.M.; Katan, M.B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutr.*, **1997**, 37, 771-785.
6. Visioli, F.; Borsani, L.; Galli, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiov. Res.*, **2000**, 47, 419-425.

- 7.Wang, H.; Provan, G.J.; Helliwell, K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Sci. and Tech.*, **2000**, 11, 152-160.
- 8.Skibola, C.F.; Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, 29, 375-383.
- 9.Dreosti, I.E. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr. Rev.*, **1996**, 54, s51-s58.
10. Ho, C.; Chen, Q.; Shi, H.; Zhang, K.; Rosen, R.T. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Med.*, **1992**, 21, 520-525.
- 11.Nishida, H.; Omori, M.; Fukutomi, Y.; Ninomiya, M.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Moriwaki, H.; Muto, Y. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. *Japan. J. of Cancer Res.*, **1994**, 85, 221-225.
- 12.Rodgers, E.H.; Grant, M.H. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem.-Biol. Interactions*, **1988**, 116, 213-228.

13. Fujita, Y.; Yamane, T.; Tanaka, M.; Kuwata, K.; Okuzumi, J.; Takahashi, T.; Fujiki, H.; Okuda, T. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. of Cancer Res.*, **1989**, 80, 503-505.
14. Takeo, T. Green tea and semi-fermented teas. In *Tea: cultivation to consumption*; Willson, K.C. e Clifford, M.N., Chapman & Hall: London, UK, **1992**; 413-454.
15. Balentine, D.A.; Wiseman, S.A.; Bouwens, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.*, **1997**, 37, 693-704.
16. Collier, P.D.; Bryce T.; Mallows, R.; Thomas, P.E.; Frost, D.J.; Korver, O.; Wilkins, C.K. The theaflavins of black tea. *Tetrahedron*, **1973**, 29, 125-142.
17. Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. of Agric. and Food Chem.*, **1993**, 41, 1242-1246.
18. Watanabe, T.; Nishiyama, R.; Yamamoto, A.; Nagai, S.; Terabe, S. Simultaneous analysis of individual catechins, caffeine, and ascorbic acid in commercial canned green and black teas by micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Sciences*, **1998**, 14, 435-438.

- 19.Wang, H.; Helliwell, K.; You, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chem.*, **2000**, 68, 115-121.
- 20.Shao, W.; Powell, C.; Clifford, M.N. The analysis by HPLC of green, black and pu'er teas produced in Yunnan. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, **1995**, 69, 535-540.
- 21.Lin, J.; Lin, C.; Liang, Y.; Lin-Shiau, S.; Juan, I. Survey of catechins, gallic acid and methylxantines in green, oolong, pu-erh and black teas. *J. of Agr. and Food Chem.*, **1998**, 46, 3635-3642.
- 22.Ding, M.; Yang, H.; Xiao, S. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, **1999**, 849, 637-640.
- 23.Bronner, W.E.; Beecher, G.R. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, **1998**, 805, 137-142.
- 24.Dalluge, J. J.; Nelson, B. C.; Thomas, J. B.; Sander, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. of Chrom. A*, **1998**, 793, 265-274.
- 25.Goto, T.; Yoshida, Y.; Kiso, M.; Nagashima, H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. of Chrom. A*, **1996**, 749, 295-299.

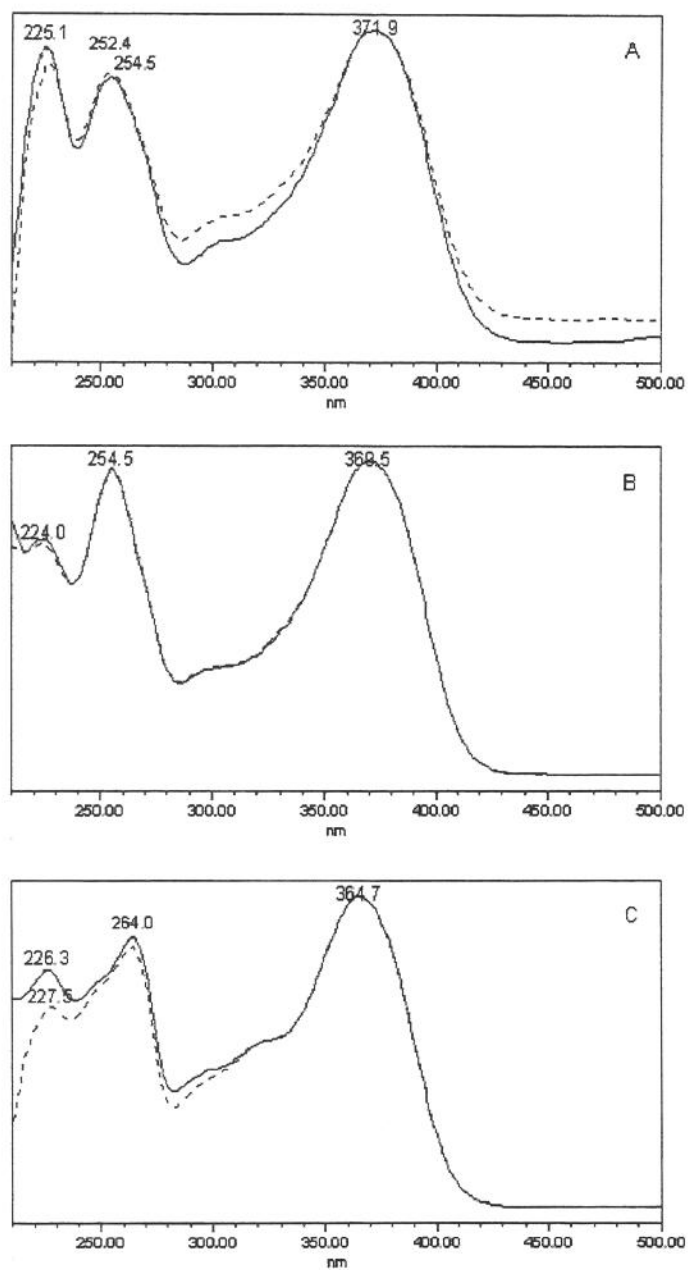
26.Price, W.E.; Spitzer, J.C. Variations in the amounts of individual flavanols in a range of green teas. *Food Chem.*, **1993**,47, 271-276.

27.Bailey, R.G.; McDowell, I.; Nursten, H.E. Use of HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, **1990**, 52, 509-525.

28.Lee, B.; Ong, C. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. of Chrom. A*, **2000**, 881, 439-447.

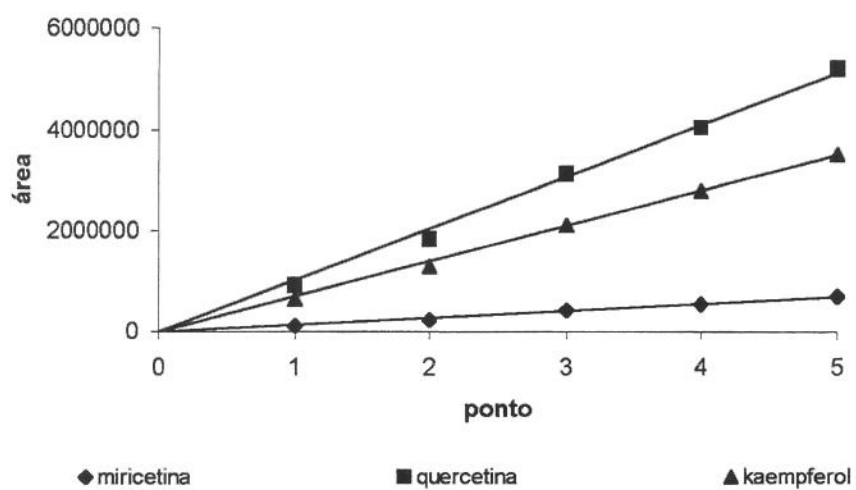
ANEXOS

ANEXO I



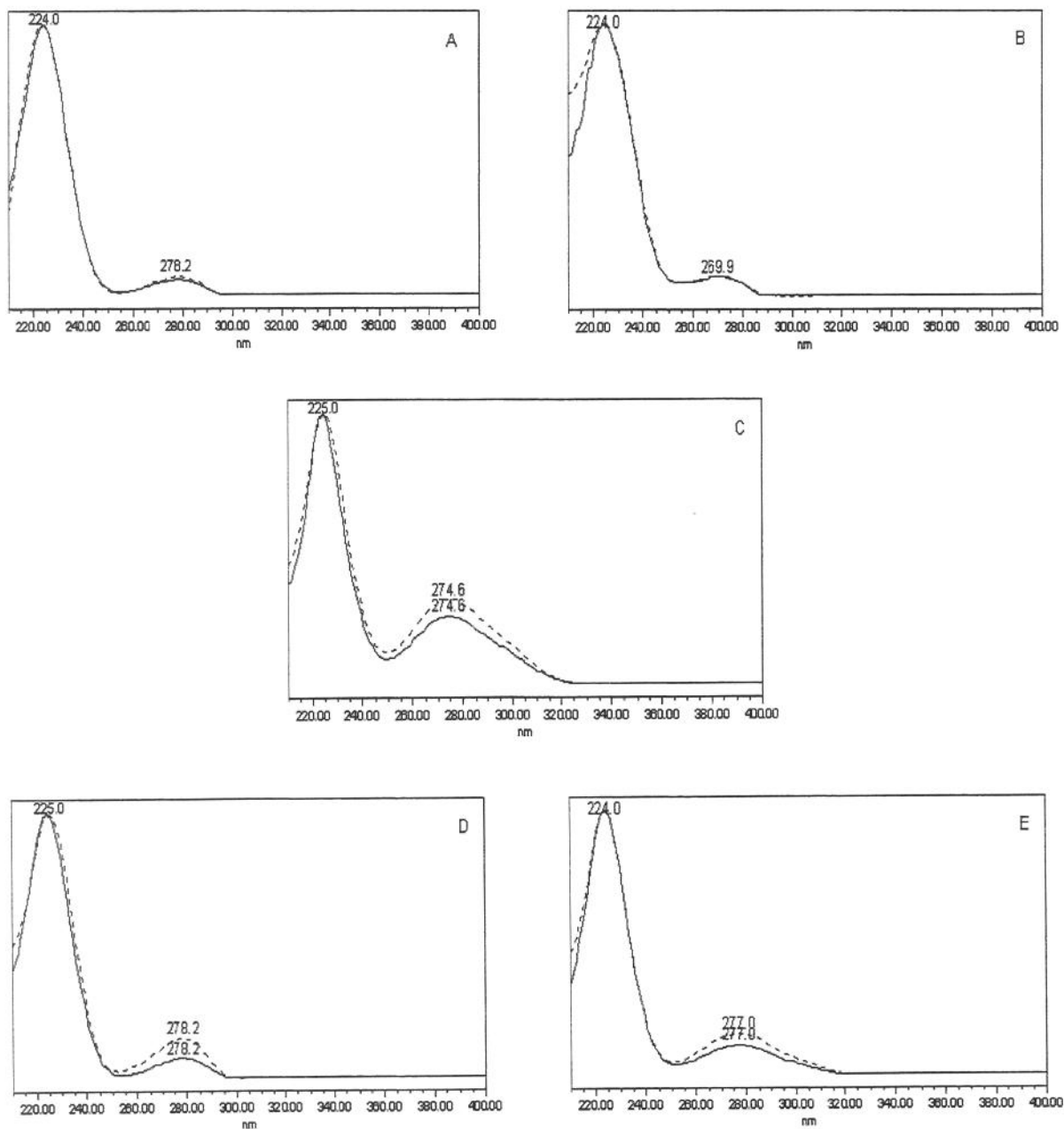
Sobreposição de espectros de absorção de padrões (- - - -) e de amostras (-----) de miricetina (A), quercetina (B) e kaempferol (C).

ANEXO II



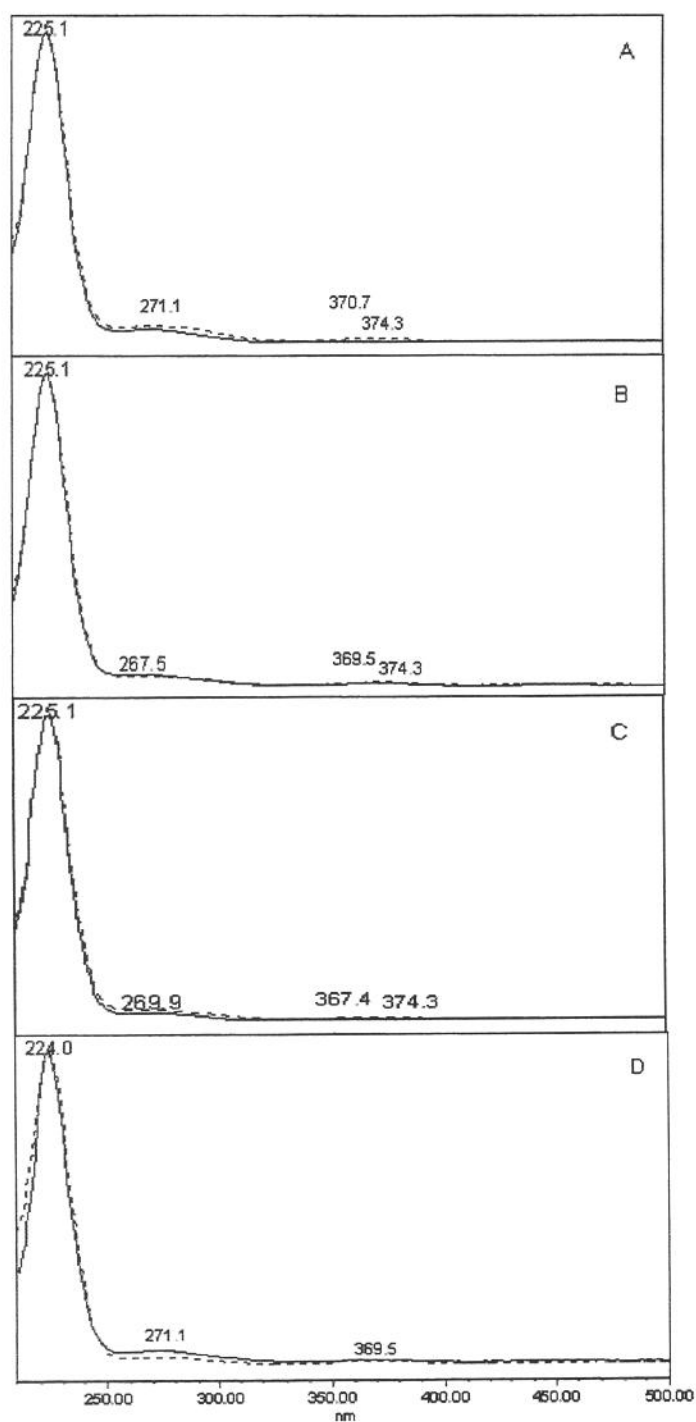
Curvas padrão de flavonóis

ANEXO III



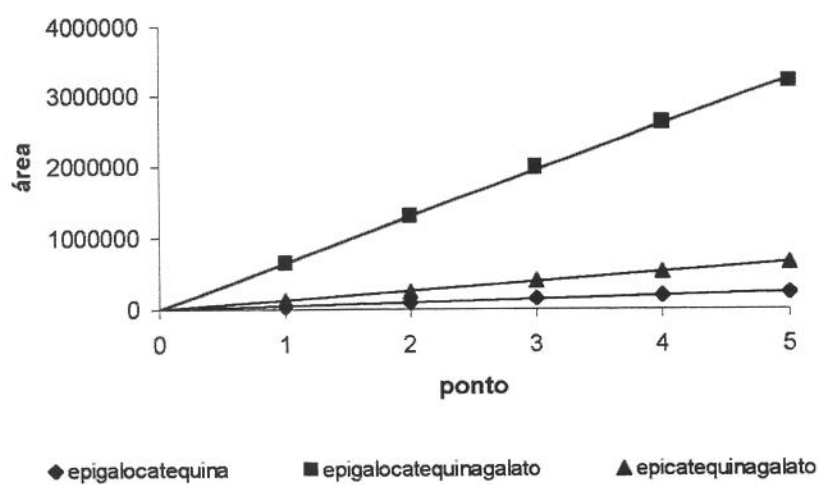
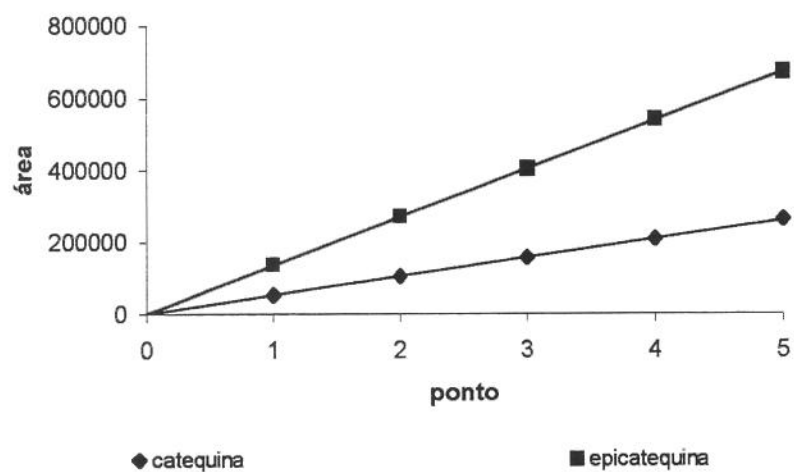
Sobreposição de espectros de absorção de padrões (- - - -) e de amostras (-----) catequina (A), epigalocatequina (B), epigalocatequinagalato (C), epicatequina (D) e epicatequinagalato (E).

ANEXO IV



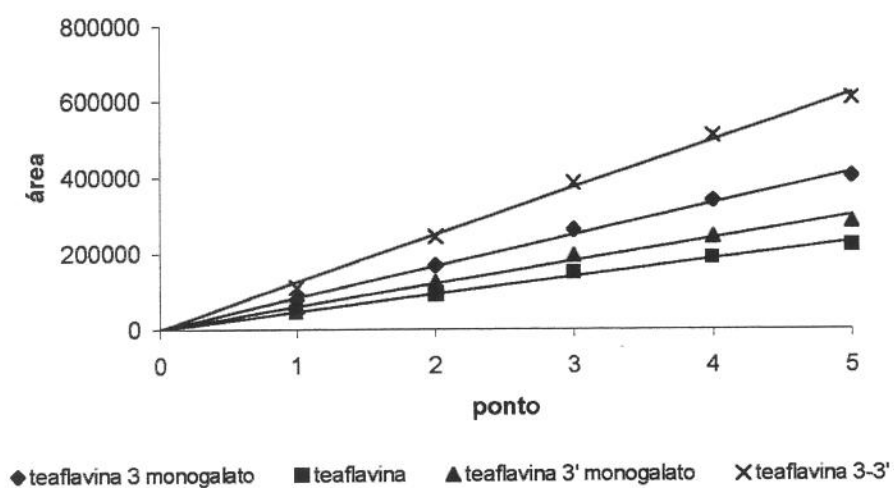
Sobreposição de espectros de absorção de padrões (- - - -) e de amostras (.....) de teaflavina 3-galato (A), teaflavina (B), teaflavina 3'-galato (C) e teaflavinas 3-3'-digalato (D).

ANEXO V



Curvas padrão de catequinas

ANEXO VI



Curvas padrão de teaflavinas