



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIS DAIANE PAULI

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE METABÓLITOS
EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DA *CAMELLIA SINENSIS* L.
UTILIZANDO MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Londrina
2015



ASSOCIAÇÃO
UEL - UEPG - UNICENTRO



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Programa de Pós-Graduação em Química
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA
UEL/UEPG/UNICENTRO

ELIS DAIANE PAULI

TESE DE DOUTORADO

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE METABÓLITOS
EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DA *CAMELLIA SINENSIS* L.
UTILIZANDO MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química-Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor - Área de concentração em Química Analítica.

Prof^a Dr^a Ieda Spacino Scarmínio

Londrina
2015

ELIS DAIANE PAULI

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE METABÓLITOS
EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DA *CAMELLIA SINENSIS* L.
UTILIZANDO MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química-Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor - Área de concentração em Química Analítica.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

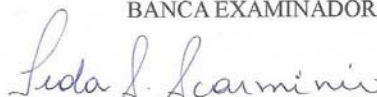
P327a	Pauli, Elis Daiane. Análise exploratória de metabólitos extraídos das folhas da <i>Camellia sinensis</i> L. utilizando métodos quimiométricos / Elis Daiane Pauli. – Londrina, 2015. 137 f.: il. Orientador: Ieda Spacino Scarminio. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015. Inclui bibliografia 1. Química analítica – Teses. 2. Fenóis – Teses. 3. Extração por solventes – Teses. 4. Plantas – Análise – Teses. 5. Quimiometria – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título. CDU 543.4
-------	---

ELIS DAIANE PAULI

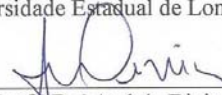
**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE METABÓLITOS EXTRAÍDOS DAS
FOLHAS DA *CAMELLIA SINENSIS* L. UTILIZANDO MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química-Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor - Área de concentração em Química Analítica.

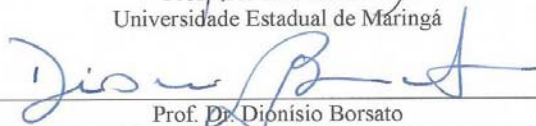
BANCA EXAMINADORA



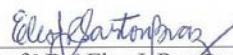
Prof.^a Dr.^a Jeda Spacino Scarmínio (Presidente)
Universidade Estadual de Londrina



Prof.^a Dr.^a Andréa Diniz
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Dionísio Borsato
Universidade Estadual de Londrina



Prof.^a Dr.^a Elen J Romão Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina



Prof.^a Dr.^a Patrícia Valderrama
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campo Mourão

Londrina, 06 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho

Ao meu grande amor, companheiro e melhor amigo, Rubinho, por nunca poupar esforços para que eu alcance meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus simplesmente por tudo.

A professora Dra. Ieda Spacínio Scarmínio pelo carinho, atenção, amizade, confiança e principalmente pelos conhecimentos compartilhados. Muito obrigada por tudo que fez por mim, para que eu chegasse até aqui. Foi muito bom trabalhar com a senhora.

Ao professor Dr. Romà Tauler pelos ensinamentos e valiosas sugestões na realização deste trabalho. Além disso, não posso deixar de agradecer por tudo que fez por mim, pelo esforço e dedicação enquanto estive em Barcelona e ao retornar.

Ao professor Dr. Roy Edward Bruns por toda a ajuda.

Aos professores do programa de Doutorado em Química que, ao longo deste período, contribuíram para minha formação.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), em especial ao Departamento de Química e ao programa de pós-graduação.

Ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por disponibilizar toda a infraestrutura para a realização experimental de parte deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro, concedendo a Bolsa, sem a qual não poderia ter realizado este trabalho.

Aos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) e CNPQ (projeto 400138/2012-3 encomenda INCT) que permitiram minha estadia de pesquisa de doutorado sanduiche no Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA- CSIC) em Barcelona (Espanha).

Ao Sr. Mauricio Takeshi Kitano da Fazenda Agrochá Boa Vista pela generosa doação das amostras.

As técnicas de laboratório Ivanira Moreira e Dalva Yamamura, por toda a ajuda e amizade.

Aos meus queridos pais, Valécio e Beatriz, pelo amor e incentivo, não apenas nestes anos de doutorado, mas em toda minha vida. Muito obrigada por acreditarem em meus sonhos e jamais medirem esforços para que eu os realizasse.

Aos meus irmãos pelo amor e amizade sincera.

Ao Rubinho, pelo amor, amizade e companheirismo. Muito obrigada por não poupar esforços, pela infinita compreensão e por sempre estar ao meu lado.

Á Fernanda Delaroza pela força e verdadeira amizade ao longo desses anos

Aos amigos Galileu B. Malta (Gali), Guilherme L. Scheel (Scheel) e Patricia Morena Sanchez (Patri) pela disponibilidade, ajuda e conversas.

Aos amigos do grupo LQCN por todo o apoio e momentos, em especial a Amelia Terrile (Amelita) por toda a ajuda.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a execução e conclusão deste trabalho.

"Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço"

(Dave Weinbaum)

PAULI, Elis Daiane. **Análise exploratória de metabólitos extraídos das folhas da *Camellia sinensis* L. utilizando métodos quimiométricos.** 2015. 137 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

RESUMO

A *Camellia sinensis* é uma fonte rica de compostos fenólicos, juntamente com a cafeína. O efeito do solvente na extração dos metabólitos foi investigado por meio de um planejamento do tipo centroide simplex envolvendo quatro solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio. Os resultados mostraram que as abundâncias relativas mais elevadas foram obtidas com etanol e suas misturas. As impressões digitais foram obtidas por técnicas espectrofotométricas (UV-Visível) e cromatográficas (CLAE-DAD e CLAE-DAD-IES/EM). Os métodos quimiométricos ACP, OSC-PLS-DA e MCR-ALS foram usados para análise exploratória dos extratos. Com a aplicação desses métodos nos dados obtidos foi possível diferenciar extratos de primeira e segunda colheita das folhas da *C. sinensis*. As bandas de absorção em 272; 410 e 663 nm, ou seja, cafeína e pigmentos foram responsáveis por essa discriminação. Maiores concentrações relativas foram obtidas nas amostras de segunda colheita. Por meio da CLAE-DAD confirmou-se a presença da cafeína e a identificação da feofitina a. As atividades antioxidantes das três principais catequinas encontradas nas folhas da *C. sinensis*, epicatequina (EC), epigallocatequina galato (EGCG) e epigallocatequina (EGC) também foram investigadas. Os resultados mostraram que as abundâncias relativas das catequinas também foram ligeiramente maiores no segundo corte, sendo EGCG > EGC, > EC para todas as misturas de solventes. Valores máximos de abundância relativa de EGCG, EGC e EC podem ser obtidos pela mistura binária etanol:acetato de etila 70:30 (v/v) e para as atividades antioxidantes pela mistura ternária entre etanol: acetato de etila:diclorometano na proporção 55:25:20 (v/v/v). Os extratos brutos de dois anos 2011 e 2012 também foram analisados por CLAE-DAD-IES/EM. Os dados de UV-Visível e EM foram interpolados e analisados simultaneamente por MCR-ALS numa matriz de dados aumentada por linha e/ou coluna para a resolução de picos coeluídos, identificação e quantificação dos metabólitos. As áreas dos picos cromatográficos foram então analisadas por OSC-PLS-DA, que permitiu a discriminação entre amostras de diferentes colheitas. A epigallocatequina e cafeína foram responsáveis por essa discriminação.

Palavras chaves: *Camellia sinensis*. ACP. OSC-PLS-DA. MCR-ALS. Planejamento experimental centroide simplex. Solventes extratores.

PAULI, Elis Daiane. **Análise exploratória de metabólitos extraídos das folhas da *Camellia sinensis* L. utilizando métodos quimiométricos.** 2015. 137 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

ABSTRACT

Camellia sinensis is a rich source of phenolic compounds and caffeine. The effect of solvent extraction of metabolites was investigated using a simplex centroid design for the ethanol, ethyl acetate, dichloromethane and chloroform. The results showed that the highest relative abundances were obtained with ethanol and mixtures thereof. Fingerprints were obtained by spectrophotometric techniques (UV-Visible) and chromatographic (HPLC-DAD and HPLC-DAD-ESI/MS). ACP, OSC-PLS-DA and MCR-ALS chemometric methods were used for exploratory analysis of the extracts. For the application of these methods on the data obtained it was possible to differentiate first and second harvest extracts from the leaves of *C. sinensis*. The absorption bands at 272; 410 and 663 nm, ie, caffeine and pigments were responsible for such discrimination. Higher relative concentrations were obtained in the second harvest samples. Through HPLC-DAD confirmed the presence of caffeine and identification of pheophytin a. The antioxidant activities of the three major catechins found in the leaves of *C. sinensis*, epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG) and epigallocatechin (EGC) were also investigated. The results showed that the relative abundance of catechins were slightly higher in the second harvest, EGCG > EGC > EC for all solvent mixtures. The maximum values for relative abundance of EGCG, EGC and EC can be obtained by the binary mixture ethanol: ethyl acetate 70:30 (v/v) and the antioxidant activity by the ternary mixture of ethanol: ethyl acetate: dichloromethane in the ratio 55:25:20 (v/v/v). Extracts of two years 2011 and 2012 were also analyzed by HPLC-DAD-ESI/MS. The UV-Visible and MS data were interpolated and simultaneously analyzed by MCR-ALS in row- and/or column-wise augmented data matrix, for the resolving coeluted peaks, identification and quantification of metabolites. The areas of the chromatographic peaks were then analyzed by OSC-PLS-DA, which allowed the discrimination between samples of different harvest. The epigallocatechin and caffeine were responsible for such discrimination.

Keywords: *Camellia sinensis*. PCA. OSC-PLS-DA. MCR-ALS. Simplex-centroid design. Extracting solvents.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Planejamento experimental do tipo centroide simplex para o estudo de misturas de quatro componentes. x_1 , x_2 , x_3 e x_4 representam as proporções dos diferentes solventes utilizados 32
- Figura 2** – Decomposição em componentes principais por ACP 35

CAPÍTULO III

- Figura 1** – Fórmula estrutural da cafeína 51
- Figura 2** – Fórmula estrutural (a) clorofila a e b. (b) feofitina a e b 52
- Figura 3** – Foto da exsicata da planta *Camellia sinensis* (L.) Kuntze depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina sob o número FUEL 49288.... 54
- Figura 4** – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo (e) etanol, (a) acetato de etila, (d) diclorometano e (c) clorofórmio..... 56
- Figura 5** – Superfície de resposta dos rendimentos dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, mostrando o efeito dos solventes extratores do planejamento experimental do tipo centroide simplex 63
- Figura 6** – Sobreposição das impressões digitais espectrais na região do UV-Visível dos extratos brutos, obtidos pelo planejamento experimental do tipo centroide simplex, das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita..... 64
- Figura 7** – Gráfico dos escores da OSC-PLS-DA (VL1 vs. VL2) das impressões digitais espectrais na região de UV-Visível (250 a 720 nm) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, obtidos pelo planejamento experimental do tipo centroide simplex 65
- Figura 8** – (a) Gráficos dos escores dos pesos (weight) das variáveis latentes (VL) 1 e 2. (b) Importância da Variável na Projeção (VIP) para a investigação da impressão digital espectral na região UV-Visível (250 a 720 nm) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita modelados por OSC-PLS-DA 66

- Figura 9** – Espectros UV-Visível obtidos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD): (a) cafeína com pico máximo no tempo de eluição de 2,54 min. (b) feofitina a com pico máximo no tempo de eluição de 1,52 min..... 67
- Figura 10** – Superfícies de resposta para os componentes: etanol, acetato de etila e diclorometano aplicadas as absorvâncias máximas da cafeína dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira(a) e segunda (b) colheita, mostrando o efeito dos solventes extratores do planejamento experimental do tipo centroide simplex 72
- Figura 11** – Superfícies de resposta para os componentes: etanol, acetato de etila e diclorometano aplicadas as absorvâncias máximas da feofitina a dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira(a) e segunda (b) colheita, mostrando o efeito dos solventes extratores do planejamento experimental do tipo centroide simplex..... 75

CAPÍTULO IV

- Figura 1** – Estabilização do radical livre DPPH[•] 84
- Figura 2** – Triângulo de seletividade de Snyder para solventes usados em cromatografia..... 87
- Figura 3** – Planejamento experimental para as fases móveis baseado nos parâmetro de seletividade de Snyder usado para a cromatografia de fase reversa, em que ST e P' representam a força e polaridade do solvente, respectivamente..... 91
- Figura 4** – Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira (I) e segunda (II) colheita extraídos de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex necessárias para sequestrar 50% do radical livre de DPPH[•] (IC_{50}). Valor mais baixo indica maior atividade antioxidante 94
- Figura 5** – Superfície de resposta para as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) necessárias para sequestrar 50% do radical livre de DPPH[•] (IC_{50}) para ambas as colheitas de folhas de *C. sinensis* em função da composição dos solventes de etanol, acetato de etila e diclorometano 96
- Figura 6** – Planejamento experimental para as fases móveis com seus respectivos cromatogramas e espectros das catequinas do extrato etanólico..... 97

- Figura 7** – Gráfico dos escores da CP₂vs. CP₃ dos cromatogramas dos extratos obtidos a partir das misturas planejamento centroide simplex e analisados utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol. e, a, d e c representam os solventes de etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, respectivamente 98
- Figura 8** – Gráficos dos loadings das CP₂ e CP₃ dos cromatogramas dos extratos brutos preparados de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex e analisados utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol 99
- Figura 9** – Variação da área do pico cromatográfico de epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC) e epigallocatequina galato (EGCG) para a primeira (a) e segunda (b) colheita extraídas de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex e analisados utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol.e, a, d e c representam os solventes de etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, respectivamente 101
- Figura 10** – Superfícies de resposta para as áreas dos picos cromatográficos da epicatequina (a), epigallocatequina (b) e epigallocatequina galato (c) para ambas as colheitas das folhas da *C. sinensis* em função da composição dos solventes de etanol, acetato de etila e diclorometano 104

CAPÍTULO V

- Figura 1** – (a) Esquema da separação das seis janelas de eluição dos cromatograma obtidos por CLAE-DAD, utilizando como exemplo o extrato bruto das folhas da *C. sinensis* extraído com etanol puro para análise por MCR-ALS. As linhas tracejadas delimitam os limites dos intervalos dos tempos de eluição. (b) MCR modelo bilinear com colunas aumentas referentes aos dados cromatográficos e espectrais dos extratos brutos obtidos por CLAE-DAD, Dkaum(DAD)N..... 118
- Figura 2** – Gráfico dos escores da CP₁vs.CP₂ dos TACs obtidos por CLAE-DAD das folhas de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita de 2011 e 2012..... 122
- Figura 3** – Gráfico dos loadings da CP₁vs.CP₂ dos TACs obtidos por CLAE-DAD das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita de 2011 e 2012..... 123

- Figura 4** – Perfis de eluição da matriz C_c aum(DAD) e espectros UV puros resolvidos por MCR-ALS analisando os extratos brutos, obtidos com etanol ou mistura de etanol no solvente extrator de primeira colheita de 2011, simultaneamente. Zoom no perfil cromatográfico do extrato bruto obtido por etanol puro..... 125
- Figura 5** – Espectros puros resolvidos por MCR-ALS, matriz $S^T c$ aum(DAD-EMpN), dos dados fundidos da matriz aumentada por linhas e colunas dos extratos brutos das folhas da *C.sinensis* da janela C, contendo etanol na composição da mistura de solventes extratores 126
- Figura 6** – Gráficos dos escores da OSC-PLS-DA (VL_1 vs. VL_2), das áreas dos picos resolvidos por MCR-ALS dos extratos que continham etanol na composição do solvente extrator das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita de 2011 (a) e 2012 (b) e suas respectivas importâncias das variáveis na projeção (VIP) de 2011 (c) e 2012 (d) 130

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO III

- Tabela 1** – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c) 57
- Tabela 2** – Rendimentos dos extratos brutos, das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, provenientes da mistura de solventes seguindo o planejamento do tipo centroide simplex entre etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c)..... 60
- Tabela 3** – Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo quadrático das porcentagens dos rendimentos dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, preparados de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex..... 62
- Tabela 4** – Valores das intensidades das absorvâncias máximas dos perfis espectrais da cafeína e feofitina a dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, obtidos pelo planejamento experimental do tipo centroide simplex 68
- Tabela 5** – Resultados da análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos quadráticos das intensidades espectrais de cafeína das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, preparados de acordo com o planejamento experimental 70
- Tabela 6** – Resultados da análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos quadráticos das intensidades espectrais de feofitina a das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, preparados de acordo com o planejamento experimental..... 73

CAPÍTULO IV

- Tabela 1** – Classificação dos solventes determinados por Snyder 86
- Tabela 2** – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c) 89

- Tabela 3** – Equações das retas e seus respectivos valores de IC_{50} dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, extraídas de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex 93
- Tabela 4** – Análise de variância (ANOVA) para ajuste do modelo dos resultados das concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* extraídos de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex necessárias para sequestrar 50% do radical livre de DPPH[•] (IC_{50})..... 95
- Tabela 5** – Análise de variância (ANOVA) para ajuste dos modelos de misturas obtidas a partir das áreas dos picos cromatográficos de EC, EGC e EGCG das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita extraídas de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex e analisadas utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol 103

CAPÍTULO V

- Tabela 1** – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c)..... 113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-p-CoQA	ácido 4-p-cumaroilquínico
a	acetato de etila
ACN	acetato de etila
ACP	análise de componente principal
ad	mistura acetato de etila:diclorometano
adc	mistura acetato de etila:diclorometano:clorofórmio
ANOVA	Análise de variância
C	catequina
c	clorofórmio
CAF	cafeína
CG	catechina galato
CLAE-DAD-IES/EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos e espectrômetro de massas - ionização por electrospray
CP	componente principal
d	diclorometano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
e	etanol
ea	mistura etanol:acetato de etila
eac	mistura etanol:acetate de etila:clorofórmio
ead	mistura etanol:acetato de etila:diclorometano
eadc	mistura etanol:acetate de etila:diclormetano:clorofórmio
EC	epicatequina
ec	mistura etanol:clorofórmio
ECG	epicatequina galato
ed	mistura etanol diclorometano
edc	mistura etanol:diclorometano:clorofórmio
EGC	epigalocatequina
EGCG	epigalocatequina galato
EMn	modo negativo
EMp	modo positivo
GC	galocatequina

GCG	galocatequina galato
H ₂ O	água
IC ₅₀	inibição de 50% da concentração de DPPH
<i>m/z</i>	razão massa sobre a carga
MCR-ALS	Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes
MeOH	metanol
mM	milimolar
OSC-PLS-DA	Correção do Sinal Ortogonal na Análise Discriminante com Métodos de Mínimos Quadrados Parciais
P'	polaridade
S ^T	força total de solvente
TAC	Cromatogramas de Absorbâncias Totais
u.a.	unidade arbitrária
UV-Visível	ultravioleta-visível
v	volume
VIP	Importância da Variável na Projeção
VL	variável latente

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	19
INTRODUÇÃO GERAL	20
CAPÍTULO II	29
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	30
Planejamento do Tipo Centroides Simplex	31
Análise de Componentes Principais (ACP)	34
Análise Discriminante com Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)	36
Pré-Processamentos Utilizados na PLS-DA	38
Resolução de Curvas Multivariadas (MCR)	41
CAPÍTULO III	49
INTRODUÇÃO	50
METODOLOGIA	53
Amostragem	53
Determinação da Umidade	54
Determinação das Cinzas Totais	55
Preparo dos Extratos Brutos	56
Análise por Espectrometria na região do UV-Visível	58
Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	58
Programas Computacionais	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	76
CAPÍTULO IV	82
INTRODUÇÃO	83
METODOLOGIA	88
Preparo das Amostras	88
Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	90
Escolha das Fases Móveis	90
Ensaio da Atividade Antioxidante	91
RESULTADOS E DISCUSSÃO	92

CONCLUSÕES	105
CAPÍTULO V	109
INTRODUÇÃO	110
METODOLOGIA	112
Material Vegetal	112
Preparo dos Extratos e Padrões de Referência	112
Condições Cromatográficas (CLAE-DAD-IES/EM)	113
Conversão dos Dados	114
ANÁLISE DOS DADOS	114
Preparação dos Dados	114
Análise de Componentes Principais (ACP)	115
Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS)	116
Correção do Sinal Ortogonal na Análise Discriminante com Métodos de Mínimos Quadrados Parciais (OSC-PLS-DA)	120
RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
CONCLUSÃO	131
CONCLUSÃO GERAL	135



CAPÍTULO I



INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são fontes de substâncias biologicamente ativas, sendo assim têm sido utilizados para fins medicinais desde os tempos antigos como remédios caseiros, suplementos alimentares, matéria-prima de fitoterápicos, entre outras maneiras¹. Podemos notar um grande avanço científico envolvendo pesquisas em plantas que visam analisar, isolar e aplicar seus constituintes químicos na fabricação de novos fármacos ou fins terapêuticos. Isso pode ser comprovado pela ampla gama de revistas e jornais científicos especializadas neste tema, como *Plant Physiology*; *Phytochemical Analysis*; *Phytochemistry Letters*; *Phytochemistry*; *Plant Science*; *Planta Medica*; *Phytomedicine*; *Natural Product Letter*, etc.

Diversos tipos de plantas são consumidos na forma de chás. Esse tipo de bebida é muito popular e considerada fonte significativa de compostos fenólicos². A Resolução RDC nº 277/05 define chá como “produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não”³. Para o preparo do chá verde ou preto especificamente, as partes do material vegetal utilizadas são as folhas e talos⁴. Segundo o Informe Técnico nº45 de 28 de dezembro de 2010 os chás são considerados alimentos, com isso não são permitidas alegações terapêuticas ou medicamentosas no rótulo do produto como consta na RDC 277/05³.

O chá modificou o modo de vida de orientais e ocidentais, redesenhou mapas territoriais e atualmente é uma das bebidas mais consumidas no mundo⁵⁻⁶. De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) a produção e consumo de chá vêm aumentando. A produção mundial de 2012 representou 4,81 milhões de toneladas contra aproximadamente 4,57 milhões em 2010. A taxa de crescimento da produção de chá preto de 2002 a 2011 foi de 1,98% e de chá verde de

6,9%⁷⁻⁸. Segundo o Grupo Intergovernamental da FAO, estima-se que a produção mundial de chá preto crescerá 1,9 % anualmente até atingir 3,28 milhões de toneladas em 2021 e de chá verde 7,2 % chegando a 2,3 milhões de toneladas⁷⁻⁸.

A espécie *Camellia sinensis*, pertencente à família *Theaceae*, é um arbusto que cresce de 10 a 15 m na natureza e de 0,6 a 1,5 m quando cultivado. Possui flores brancas axilares, solitárias ou até três por cacho, com diâmetros de 2,5 cm e de seis a oito pétalas. Suas sementes são marrom, subglobosa de 1 a 1,4 cm de diâmetro⁹, suas folhas simples, alternadas, inteiras, com margem serrada e textura coriácea com largura aproximada de 4 cm e comprimento que pode variar de 5 a 30 cm¹⁰. Comercialmente existem três tipos principais de chá, onde seus diferenciais são atribuídos ao processamento das folhas da *C. sinensis*: preto (fermentado), *oolong* (parcialmente fermentado) e verde (não fermentado)¹¹⁻¹⁴. O tipo de chá mais consumido no mundo é o preto que corresponde a 78%, já o chá verde 20%¹⁵.

Na produção do chá preto, as folhas são expostas para a redução de umidade e então se tornam macias para serem enroladas, esmagadas ou quebradas. Isso ocasiona a perturbação da compartimentação ou rompimento do vacúolo da célula, permitindo a liberação da enzima polifenoloxidase, que causa a fermentação por meio da polimerização e condensação oxidativa das catequinas catalisadas. Na sequência, as folhas são colocadas em câmaras de ar quente para secar e bloquear a sua fermentação pela desnaturação das enzimas. No chá *oolong* o processamento ocorre da mesma maneira do chá preto, porém o tempo de fermentação é menor. Para o chá verde as folhas são picadas e submetidas a um cozimento a vapor. Nesse procedimento as folhas tornam-se mais flexíveis e maleáveis e então são colocadas em bandejas aquecidas, com o intuito de romper a estrutura celular, inativando a enzima e consequentemente inibindo a fermentação¹⁶⁻²⁰.

Nos últimos anos, o interesse no chá verde tem aumentado devido aos seus efeitos medicinais e farmacológicos atribuídos aos compostos polifenólicos. Esses possuem efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante na captura de radicais livres especialmente os flavonóides presentes na forma de catequinas, que representam de 25 a 35% do peso seco das folhas²¹⁻²³. Nas folhas do chá verde encontramos as seguintes catequinas: (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-catequina galato (CG), (-)-galocatequina galato (GCG), (-)-epicatequina galato (ECG) e (-)-epigalocatequina galato (EGCG)²⁴. No entanto, as principais são: EC, ECG, EGC, e EGCG, sendo que esta última correspondente de 50 a 80% das catequinas presentes no chá²⁵⁻²⁸. Essas catequinas são responsáveis pelo sabor adstringente e amargo do chá verde e tem recebido atenção considerável devido às suas propriedades benéficas para a saúde como a prevenção de doenças cardiovasculares²⁹ e câncer³⁰⁻³², bem como efeitos anti-hipertensivo³³⁻³⁴, antiinflamatório³⁵, antiobesidade³⁶ e antienvhecimento³⁷. Porém, vale ressaltar que o chá verde possui muitos outros metabólitos, como a cafeína, clorofila, compostos voláteis, aminoácidos, carboidratos, proteínas, mineiras, oligoelementos, etc³⁸⁻⁴⁰.

Uma vez que o consumo de chá verde é atribuído aos benefícios à saúde, tem aumentado os estudos sobre seus constituintes assim como o efeito dos metabólitos, quanto à incidência de luz, sazonalidade, idade das folhas, diferentes tipos e cultivares, entre outros parâmetros^{12,28,41-45}. As variações nas quantidades dos metabólitos em diferentes colheitas das folhas de chá verde também vêm sendo estudadas⁴⁶⁻⁴⁷, porém carecem ainda de estudos. As folhas da *C. sinensis* contém um grande número de metabólitos, onde a utilização de ferramentas analíticas e quimiométricas adequadas que permitam a identificação e indiquem fontes de variação são de primordial importância.

A extração de compostos em diferentes sistemas de solventes tem sido proposta⁴⁸, no entanto, há uma falta de estudos na literatura comparando diferentes solventes.

Atualmente muitas técnicas analíticas têm sido usadas para identificar e quantificar os constituintes químicos de amostras complexas, incluindo cromatografia de camada delgada (CCD)⁴⁹, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)²⁸, espectroscopia de infravermelho, espectrofotometria ultravioleta-visível, técnicas hífenadas como cromatografia líquida com espectrometria de massas (CLAE-EM)⁵⁰, entre outras. Devido à quantidade e a complexidade dos dados obtidos bem como a dificuldade na interpretação durante a análise, métodos quimiométricos são usados como ferramenta para analisar e interpretar estes dados.

Nesta tese amostras de *C. sinensis*, de duas colheitas do mesmo ano, bem como de dois anos diferentes foram comparadas. Os objetivos desta tese e as conclusões essenciais estão discutidos em três capítulos (3, 4 e 5), sendo uma publicação, um artigo submetido e outro em elaboração em relação à pesquisa estabelecida.

No Capítulo 2, estão apresentados os conceitos dos métodos quimiométricos utilizados nesta pesquisa.

No Capítulo 3, o objetivo geral foi avaliar o potencial da impressão digital espectrofotométrica UV-Visível, associada à análise discriminante por mínimos quadrados parciais na tentativa de discriminar as folhas de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita e indicar o(s) metabólito(s) responsável(is). Além disso, uma análise exploratória foi realizada para investigar os efeitos dos solventes extratores sobre os metabólitos discriminados na análise quimiométrica, utilizando um planejamento de mistura do tipo centroide simplex de quatro componentes.

No Capítulo 4, o objetivo foi investigar os efeitos dos diferentes solventes na extração de epicatequina, epigallocatequina galato e epigallocatequina, bem como sobre

as suas atividades antioxidantes das folhas da *C. sinensis*. Além disso, um planejamento experimental envolvendo mistura de água com diferentes modificadores orgânicos também foi utilizado para investigar diferentes fases móveis na separação de picos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). A análise de componente principal (ACP) foi então utilizada para comparar as impressões digitais cromatográficas para os diferentes extratos. Artigo desse capítulo intitulado como “*Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the Camellia sinensis L. leaves*” foi publicado na Analytical Chemistry Research em 2014. [doi:10.1016/j.ancr.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ancr.2014.08.001)

No Capítulo 5, o objetivo geral foi analisar os metabólitos extraídos de acordo com o planejamento do tipo centroide simplex, por CLAE-DAD-IES/EM. Os dados obtidos por DAD e EM, das diversas corridas cromatográficas, apresentam resultados com resoluções muito distintas por serem técnicas diferentes. Assim uma estratégia adequada foi proposta para resolver as sobreposições de metabólitos a partir da análise simultânea de dados de DAD e EM por MCR-ALS. Essa estratégia permite uma melhor identificação e quantificação dos componentes resolvidos. A OSC-PLS-DA foi aplicada às áreas dos picos na tentativa de discriminar as amostras de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita a partir dos metabólitos identificados por MCR-ALS e investigar qual o constituinte responsável por tal discriminação.

REFERÊNCIAS

- ¹CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R.; BEZERRA, A.M.E.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G.S.B. Phytochemistry, pharmacology and agronomy of medical plants: *Amburana cearenses*, an interdisciplinary study. In: RAO, V. (Ed.). *Phytochemistry – A global perspective of their role in nutrition and health*. Rijeka: Intech, 2012. p. 353-374.
- ²ASOLINI, F.C.; TEDESCO, M.; CARPES, S.T. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, p. 209-215, 2006.
- ³BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-Mate e Produtos Solúveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 ago.2005a.
- ⁴BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 ago.2005b.
- ⁵MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chá comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 380-385, 2006.
- ⁶GRACINDO, I. Viagem ao mundo do chá: Tao Te Cha. 1. ed. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2013. 237 p.
- ⁷FOA - Food and Agriculture Organization of the United Nations. —Production [FAOSTAT](http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor). Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em 03 de julho de 2014a.
- ⁸FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - Intergovernmental Group on Tea - Current situation and medium term outlook for tea. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tea/Documents/IGG_20/12-CRS7-CurrentSit_01.pdf Acesso em 03 de julho de 2014.
- ⁹AHMED, S.; STEPP, J. R. Green tea: the plants, processing, manufacturing and production. In: PREEDY, V.R. (Ed.). *Tea in health and disease prevention*. San Diego: Academic Press, 2013. p. 19-31.
- ¹⁰ROSS, I. A. *Camellia sinensis* L. In: _____. *Medical plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medical uses*. Totowa: Humana Press, 2005. p. 1-27. 3 v.
- ¹¹CHEN, Q.; ZHAO, J.; GUO, Z.; WANG, X. Determination of caffeine content and main catechins in green tea (*Camellia sinensis* L.) using taste sensor technique and multivariate calibration. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 353-358, 2010.
- ¹²KU, K. M.; CHOI, J. N.; KIM, J.; KIM, J. K.; YOO, L. G.; LEE, S. J.; HONG, Y. S.; LEE, C. H. Metabolomics analysis reveals the compositional differences of shade grown tea (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 418-426, 2010.

- ¹³SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis*) - A review. *Food Research International*, v. 42, p. 529-535, 2009.
- ¹⁴SERESHTI, H.; SAMADI, S.; JALALI-HERAVI, M. Determination of volatile components of green, black, oolong and white tea by optimized ultrasound-assisted extraction-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1280, p. 1-8, 2013.
- ¹⁵HE, W.; HU, X.; ZHAO, L.; LIAO, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; WU, J. Evaluation of Chinese tea by the electronic tongue: Correlation with sensory properties and classification according to geographical origin and grade level. *Food Research International*, v. 42, p. 1462-1467, 2009.
- ¹⁶PAGANINI-COSTA, P., SILVA, D.C. Uma xícara (chá) de química. *Revista Vistual de Química*, v. 3, p. 27-36, 2011.
- ¹⁷RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidant capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, v. 110, p. 852-858, 2008.
- ¹⁸SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G.A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.Y.; DASHWOOD, R.H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, v. 495, p. 61-74, 2001.
- ¹⁹WAN, X.; LI, D.; ZHANG, Z. Green tea and black tea: Manufacturing and consumption. In: HO, C.T.; LIN, J.K.; SHAHIDI, F. (Eds). *Tea and tea products: Chemistry and health-promoting properties*. New York: CRC Press, 2008. p. 1-8.
- ²⁰WEISBURGER, J.H. Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters*, v. 114, p. 315-317, 1997.
- ²¹SENANAYAKE, S. P. J. N. Green tea extract: chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal Functional Food*, v. 5, p. 1529-1541, 2013.
- ²²YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 64-71, 2006.
- ²³WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, v. 105, p. 940-949, 2007.
- ²⁴DALLUGE, J.J.; NELSON, B.C. Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 411-424, 2000.
- ²⁵ANANINGSIH, V.K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, v. 50, p. 469-479, 2013.
- ²⁶KHAN, N., MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Science*, v. 81, p. 519-533, 2007.

- ²⁷McKAY, D. L.; BLUMBERG, J.B. The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 21, p. 1–13, 2002.
- ²⁸SONG, R.; KELMAN, D.; JONH, K.L.; WRIGHT, A.D. Wright. Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii. *Food Chemistry*, v. 133, p. 707-714, 2012.
- ²⁹NIKASHI, K., MATSUYAMA, S., MIYAKE, S., SUGANUMA, M., IMAI, K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors*, v. 3, p. 49-54, 2000.
- ³⁰CHUNG, F. L.; SCHWARTZ, J.; HERZOG, C. R. YANG, Y. M. Yang, Tea and cancer prevention: Studies in animals and humans. *Journal of Nutrition*, v, 133, p. 3268–3274, 2003.
- ³¹FUJIKI, H.; SUGANUMA, M.; IMAI, K.; NAKACHI, K. Green tea: Cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Letter*, v. 188, p. 9-13, 2002.
- ³²JIAN, L.; XIE, L.P.; LEE, A.H.; BINNS, C.W. Protective effect of green tea against prostate cancer: A case-control study in south east China. *International Journal of Cancer*, v. 108, p. 130–135, 2004.
- ³³LEUNG, L.K. SU, Y.; CHEN, R. ZHANG, Z.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants, *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 2248-2251, 2001.
- ³⁴YANG, Y. C.; LU, F.H.; WU, J. S.; WU, C. H.; CHANG, C. J. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Archives of Internal Medicine*, v. 164, p. 1534–1540, 2004.
- ³⁵KANDA, H.; LI, P.; MAKINO, H. Production of decaffeinated green tea leaves using liquefied dimethyl ether. *Food and Bioproducts Processing*, v., 91, p. 376–380, 2013.
- ³⁶SUZUKI, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M. Health-promoting effects of green tea. *Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences*, v. 88, p. 88–101, 2012.
- ³⁷VAYALIL, P.K.; ELMETS, C. A.; KATIYAR, S. K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*, v. 24, p. 927-936, 2003.
- ³⁸CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea - A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, v, 25, p. 79–99, 2006.
- ³⁹GRAHAM, A. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, v. 21, p. 334-350, 1992.
- ⁴⁰SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, v. 42, p. 529-535, 2009.

- ⁴¹CHEN, Y., MINGGE, Y., XU, J., CHEN, X., SHI, J. Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, p. 2350-2355, 2009.
- ⁴²MOHANPURIA, P., KUMAR, V., JOSHI, R., GULATI, A., AHUJA, P.S., YADAV, S.K.T. Caffeine Biosynthesis and Degradation in Tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] is under Developmental and Seasonal Regulation. *Molecular Biotechnology*, v. 43, p. 104-111, 2009.
- ⁴³UNACHUKWU, U.J., AHMED, S., KAVALIER, A., LYLES, J.T., KENNELLY, E.J. White and Green Teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): Variation in Phenolic, Methylxanthine, and Antioxidant Profiles. *Journal of Food Science*, v. 75, p. C541-C548, 2010.
- ⁴⁴WEI, K., WANG, L.Y., ZHOU, J., HE, W., ZENG, J.M., JIANG, Y.W., CHENG, H. Comparison of catechins and purine alkaloids in albino and normal green tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) by HPLC. *Food Chemistry*, v. 130, p. 720-724, 2012.
- ⁴⁵ZHAO, Y., CHEN, P., LIN, L., HARNLY, J.M., YU, L.L., LI, ZHANGWAN. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. *Food Chemistry*, v. 126, p. 1269-1277, 2011.
- ⁴⁶ERCISLI, S., ORHAN, E., OZDEMIR, O., SENGUL, M., GUNGOR, N. Seasonal Variation of Total Phenolic, Antioxidant Activity, Plant Nutritional Elements, and Fatty Acids in Tea Leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis* clone Derepazari 7) Grown in Turkey Sezai. *Pharmaceutical Biology*, v., 46, p. 683-687, 2008.
- ⁴⁷YAO, L., CAFFIN, N., D'ARCY, B., JIANG, Y., SHI, J., SINGANUSONG, R., LIU, X., DATTA, N., KAKUDA, Y., XU, Y. Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Australia-Grown Tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 6477-6483, 2005.
- ⁴⁸SOARES, P.K., BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Principal component and Tucker3 analyses of high performance liquid chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *Analytica Chimica Acta*, v. 736, p. 36-44, 2012.
- ⁴⁹OVK, I.; SIMONOVSKA, B.; VUORELA, H. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography A*, v. 1077, p. 188-194, 2005.
- ⁵⁰DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; MULLER, W.; BURNS, J.; LEAN, M.E.J.; BRIGHENTI, F.; CROZIER, A. HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2807-2015, 2004.



CAPÍTULO II



MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

O experimento metabolômico (amostragem, preparação da amostra, instrumentação analítica e preparação e interpretação dos dados), tem como objetivo obter informação biológica relacionada ao metaboloma¹. O metaboloma representa uma série dos metabólitos que existem em uma espécie biológica¹. Na análise metabolômica o objetivo é analisar tantos metabólitos quanto possível em uma única análise. Portanto, o extrato não é usualmente purificado, em contraste com os procedimentos de rotina usados para análise de metabólitos específicos. Sendo assim, uma abordagem mais adequada é analisá-los por meio da “impressão digital dos metabólitos”. A análise da impressão digital é aceita pela *World Health Organization* (WHO)². Entre uma variedade de métodos, a impressão digital cromatográfica tem sido aceita como método de controle de qualidade por órgãos oficiais como *Food and Drug Administration*³ e a *European Agency for the Evaluation of Medicinal*⁴.

A análise multivariada de dados compreende métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas medidas ou variáveis, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informações⁵⁻⁷. A década de 70 marca o início da atividade de pesquisa concentrada na quimiometria⁸. Esse campo é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências. Ela também visa permitir a obtenção do máximo de informações com um número reduzido de experimentos a partir da análise de dados químicos⁹.

Neste trabalho utilizou-se o planejamento de misturas do tipo centroide simplex para analisar o efeito do solvente extrator sobre os extratos brutos obtidos e ferramentas quimiométricas como Análise de Componentes Principais (ACP), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *Partial Least Squares*

Discriminant Analysis - PLS-DA) e Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (do inglês, *Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares – MCR-ALS*) de acordo com os respectivos objetivos de análise onde são discutidos com detalhes abaixo.

Planejamento do Tipo Centroide Simplex

O planejamento experimental utilizando misturas é aplicado com dois ou mais componentes misturados, em quaisquer proporções, sendo que uma resposta é obtida para cada conjunto de componentes. A soma das proporções numa mistura deve ser sempre 100%. Uma mistura de q componentes pode ser descrita pela Equação 1¹⁰⁻¹¹. Neste tipo de planejamento pode-se identificar uma melhor combinação para a resposta que se quer ou simplesmente a obtenção de uma melhor compreensão de todo o sistema através da análise do comportamento de mistura de cada componente presente¹².

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad \text{Eq. 1}$$

onde, x_i representa a proporção do i -ésimo componente.

Para especificar a composição da mistura, devem-se fixar as proporções de $(q - 1)$ componentes, onde a proporção do último componente será sempre o que faltar para completar 100%¹¹. No sistema estudado, o planejamento experimental de misturas do tipo centroide simplex foi composto por quatro diferentes solventes, onde a representação básica é um tetraedro. Os pontos puros do planejamento correspondem a q permutações, ou seja, 1,0,0,0. Já as misturas binárias contêm permutações do tipo $q/2$; misturas ternárias $q/3$ e misturas quaternárias $q/4$. Portanto, nesse tipo de planejamento

temos um total de 15 misturas diferentes, ou seja, quatro componentes puros, seis nas misturas binárias, quatro nas ternárias e uma mistura quaternária, conforme Figura 1.

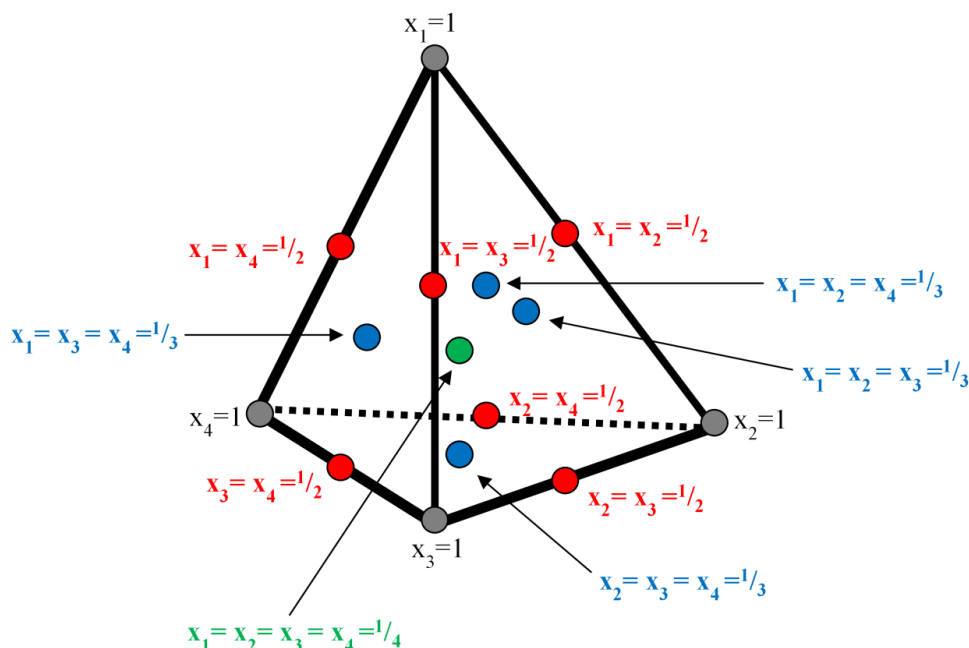


Figura 1 – Planejamento experimental do tipo centroide simplex para o estudo de misturas de quatro componentes. x_1 , x_2 , x_3 e x_4 representam as proporções dos diferentes solvente utilizados.

Após a realização dos experimentos, os dados obtidos são ajustados e um polinômio com o número de termos a estimar ou parâmetros a estimar, podendo ser no máximo igual ao número de pontos do planejamento, é ajustado. Em geral, o polinômio para quatro componentes é definido pela Eq. 2¹¹:

$$\hat{y} = \sum_i^4 b_i x_i + \sum_i \sum_{<j}^4 b_{ij} x_i x_j + \sum_i \sum_{<j} \sum_{<k}^4 b_{ijk} x_i x_j x_k + \dots + b_{1234} x_1 x_2 x_3 x_4 \quad \text{Eq. 2}$$

em que, b_i é o coeficiente linear do componente e representa a resposta esperada para o componente puro i , b_{ij} é o coeficiente da interação entre os componentes i e j ; b_{ijk} é o coeficiente da interação entre os componentes i , j e k e b_{1234} é o coeficiente da interação entre os componentes 1, 2, 3 e 4.

Os parâmetros de \mathbf{b} e seus respectivos erros padrão ($\mathbf{V}(\mathbf{b})$) são calculados pelas Eqs. 3 e 4, respectivamente:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \quad \text{Eq. 3}$$

$$\mathbf{V}(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} s^2 \quad \text{Eq. 4}$$

em que, \mathbf{X} é a matriz contendo os pontos do planejamento, o sobrescrito T indica a transposta da matriz e $^{-1}$ a inversão da matriz; \mathbf{Y} é o vetor das respostas e s^2 é a variância em \mathbf{Y} .

A análise de variância (do inglês, *Analysis of Variance* - ANOVA) é usada para testar a adequação dos modelos matemáticos aos resultados experimentais individuais obtidos por meio do planejamento de misturas. A falta de ajuste da regressão é testada comparando $F_{\text{calculado}}$, que é a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro ($\text{MQ}_{\text{faj}}/\text{MQ}_{\text{ep}}$), com $F_{\text{tabelado}}(m-p),(n-m)$, onde m significa o número de níveis distintos da variável independente; p o número de parâmetros do modelo e n o número total de observações. Portanto, se F_{tabelado} for maior que $F_{\text{calculado}}$, não há indicação de falta de ajuste para o modelo. Podemos testar se a regressão é estatisticamente significativa e útil para fazer previsões, pela da razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo (MQ_R/MQ_T), seguindo uma distribuição $F_{\text{tabelado}}(p-1),(n-p)$. Se F_{tabelado} for menor que $F_{\text{calculado}}$ a equação é significativa e útil para fazer previsões. O coeficiente de determinação (R^2) para esse ajuste é calculado pela razão da soma dos quadrados da regressão e total (SQ_R/SQ_T). O valor máximo que R^2 poderia explicar é dado pela subtração da soma quadrática total e do erro puro e esse valor dividido pela soma quadrática total $[(\text{SQ}_T - \text{SQ}_{\text{ep}})/\text{SQ}_T]^{11}$.

Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise de componentes principais calcula novas variáveis ortogonais chamadas componentes principais que são combinações lineares das variáveis originais e explica a maior parte da variância dos dados¹³. A ACP é um dos métodos multivariados mais utilizados para a análise exploratória de dados, detecção de *outlier*, gráfico de agrupamentos, classificação e redução da dimensionalidade (*rank*). A redução da dimensionalidade do conjunto de variáveis originais fornece um número reduzido de novas variáveis, que mesmo assim representa a variabilidade contida nos dados originais. Sendo que, a interpretação dos dados está baseada na análise simultânea das variáveis^{5,14-15}.

Esse método é comumente empregado na análise de informações devido a sua capacidade de compressão de dados em função da correlação entre diversas variáveis medidas¹⁶. Os dados experimentais são organizados em uma matriz \mathbf{X} formada por n linhas que representam as amostras e p colunas que representam as variáveis ($n \times p$)¹⁷. Para a análise de componentes principais o primeiro passo é a formação da matriz de variância/covariância dos dados \mathbf{Z} para isolar a fonte de variação dos dados, conforme Eq. 5:

$$\mathbf{Z} = \mathbf{X}^T \mathbf{X} \quad \text{Eq. 5}$$

Na sequência a matriz \mathbf{Z} é diagonalizada por uma transformação unitária:

$$\mathbf{\Lambda} = \mathbf{P}^{-1} \mathbf{Z} \mathbf{P} \quad \text{Eq. 6}$$

em que, $\mathbf{\Lambda}$ é uma matriz diagonal onde os elementos são autovalores de \mathbf{Z} e \mathbf{P} é a matriz de autovetores, denominadas *loadings*. Como consequência a nova base explica a variância dos dados em \mathbf{X} e a projeção dos dados nessa base é denominada escores \mathbf{T} ¹⁸.

Matematicamente, cada componente principal pode ser descrita como uma combinação linear das variáveis originais onde a importância de cada uma dessas variáveis é dada pelos *loadings*. Essa combinação linear fornece ainda para cada amostra, valores chamados escores. Portanto, a ACP pode ser definida tanto no espaço das amostras como das variáveis, sendo que sua decomposição é calculada através da diagonalização da matriz de associação ($\mathbf{X}\mathbf{X}^T$) ou da matriz de covariância ($\mathbf{X}^T\mathbf{X}$), respectivamente¹⁹. Então, a ACP decompõe a matriz \mathbf{X} em uma matriz de escores ($\mathbf{T}_{n \times a}$) e uma matriz de pesos ou *loadings* ($\mathbf{P}_{a \times p}$), onde a é o número de componentes principais, conforme Figura 2 e Eq. 7^{14,20}.

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{E} \quad \text{ou} \quad \mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 7}$$

em que, \mathbf{X} é a matriz dos dados originais, \mathbf{T} são os valores dos escores que representam as coordenadas das amostras, \mathbf{P} são os *loadings* que contém a informação de pesos de cada variáveis original na formação dos novos eixos e \mathbf{E} a matriz dos resíduos.

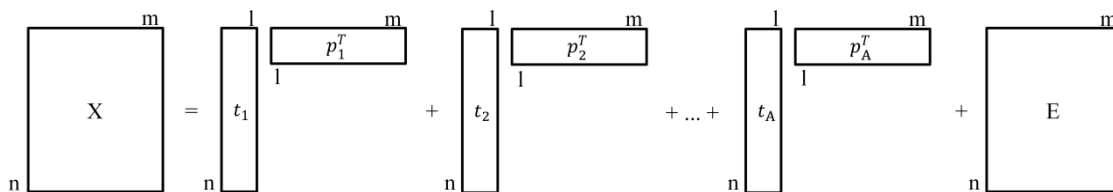


Figura 2 – Decomposição em componentes principais por ACP (figura adaptada de ESBENSEN & GELADI (2009)¹⁴).

A primeira componente principal, CP_1 , é a combinação linear de máxima variância. A segunda componente, CP_2 , também de máxima variância, é ortogonal a CP_1 . Já a terceira é ortogonal às duas primeiras CPs, e assim por diante. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, muitas vezes a informação

relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras CPs. A ACP é um método não supervisionado onde não se dispõe de informação prévia sobre a classificação das amostras, ou seja, essa informação não é utilizada na construção do modelo⁸.

Análise Discriminante com Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

O PLS-DA²¹ (do inglês, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) é um método multivariado utilizado para classificar amostras onde é necessária a redução de variáveis e a variabilidade dentro do grupo é maior que a variabilidade entre grupos. Esse modelo é desenvolvido a partir dos algoritmos da regressão por PLS. A principal finalidade da regressão é construir um modelo linear:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 8}$$

em que, a matriz \mathbf{Y} de dimensões (nxm) que corresponde à propriedade de interesse n é o número de amostras e m o número de propriedades; a matrix \mathbf{X} com dimensões (nxj) representa a resposta instrumental, onde j é o número variável; \mathbf{B} é uma matriz de dimensões (kxm) dos coeficientes da regressão, em que k é o número de variáveis latentes e \mathbf{E} a matriz dos resíduos para o modelo que tem a mesma dimensão de \mathbf{Y} . As matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas em variáveis latentes, a fim de reduzir o tamanho dos dados:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 9}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 10}$$

em que, \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes de escores contendo linhas ortogonais; \mathbf{P} corresponde aos *loadings* da matriz \mathbf{X} ; \mathbf{E} é a matriz residual da matriz \mathbf{X} ; \mathbf{Q} *loadings* da matriz \mathbf{Y} e \mathbf{F} a matriz residual da matriz \mathbf{Y} .

No método PLS a ideia é extrair componentes que consigam capturar as variáveis das covariáveis e também obter as correlações com as variáveis dependentes. Isso é alcançado maximizando a covariância entre os fatores \mathbf{X} , \mathbf{Y} e as novas componentes. Em PLS existe um compromisso entre a variância explicada em \mathbf{X} e a correlação com \mathbf{Y} . Geralmente os números de variáveis latentes (VL) são pequenos. Os escores \mathbf{t} , são ortogonais e estimados como combinações lineares das variáveis originais com os coeficientes pesos “weight” (\mathbf{w})²²⁻²³, onde maiores detalhes podem ser encontrados em Wold et al. (2001)²⁴.

$$\mathbf{t} = \mathbf{X}\mathbf{w}^* \quad \text{Eq. 11}$$

A diferença entre os modelos PLS e PLS-DA é que neste último o bloco \mathbf{Y} indica a classe à qual a amostra pertence. Portanto, quando se tem duas classes a serem discriminadas, utiliza-se o método PLS1, onde existe uma variável independente \mathbf{Y} que pode assumir os valores 0 ou 1, caracterizando as classes.

Para interpretar os resultados mais significativos é importante verificar qual(is) das variáveis medidas mais contribuem para a definição do modelo. Neste caso, essa informação pode ser adquirida pelo índice chamado Importância da Variável na Projeção (do inglês, *Variable Importance in Projection* - VIP)²⁵. O VIP é um índice que expressa se um predito é significativo na definição do modelo de vetores latentes H de uma resposta particular. Neste caso a intenção é acumular a importância de cada variável h , sendo refletida pelo peso (w_h) de cada variável latente. O VIP é definido pela Eq. 12²⁶:

$$\text{VIP}_j = \sqrt{\frac{p \sum_{h=1}^H [\text{SS}_h (w_{hj} / \| \mathbf{w}_h \|^2)]}{\sum_{h=1}^H (\text{SS}_h)}} \quad \text{Eq. 12}$$

em que, SS_h é a soma dos quadrados descritos pelas h variáveis latentes, onde p é número de variáveis experimentais. Assim o VIP é uma medida da contribuição de cada variável de acordo com a variância descrita por cada componente do PLS, onde $(w_{hj}/\|\mathbf{w}_h\|)^2$ representa a importância da variável j . A estimativa da contribuição das variáveis originais do modelo PLS podem ser demonstrada pela média quadrática dos VIP maiores que 1. Esse critério é geralmente utilizado para a seleção de variáveis mais significativas.

Pré-Processamentos Utilizados na PLS-DA

Os dados analisados neste trabalho utilizando o método por PLS-DA foram pré-processados e essa manipulação foi avaliada caso a caso. Por fim os melhores e mais coerentes pré-processamentos foram: autoescalonamento, centralização dos dados na média e correção do sinal ortogonal (do inglês, *Orthogonal Signal Correction* - OSC).

O autoescalonamento é aplicado quando se quer dar a mesma importância a todas as variáveis. Neste caso, calcula-se a variância dos dados, s_j^2 , utilizando a Eq. 13²⁷:

$$s_j^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 \quad \text{Eq. 13}$$

Onde a média \bar{X}_j foi obtida pela Eq. 14:

$$\bar{X}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_{ij} \quad \text{Eq. 14}$$

Na sequência os dados originais de cada elemento (X_{ij}) são subtraídos pela média dos valores desta mesma coluna \bar{X}_j e divididos pelo desvio padrão.

$$X_{ijAE} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{s_j} \quad \text{Eq. 15}$$

O desvio padrão s_j foi obtido pela raiz quadrada da variância:

$$s_j = \sqrt{s_j^2} \quad \text{Eq. 16}$$

No pré-processamento dos dados centrados na média (Eq. 17), basicamente os dados originais de cada elemento da coluna (X_{ij}) são subtraídos pela média dos valores desta mesma coluna \bar{X}_j . O resultado obtido é uma matriz com todas as colunas com média zero²⁷.

$$X_{ijCM} = X_{ij} - \bar{X}_j \quad \text{Eq. 17}$$

A correção do sinal ortogonal (OSC)²⁸ é um método desenvolvido para remover a variação sistemática na matriz de dados \mathbf{X} que não está correlacionada (isto é, ortogonal) à matriz de resposta \mathbf{Y} . Conseqüentemente, esse pré-processamento melhora e torna mais simples modelos PLS. A principal vantagem de usar o OSC no PLS-DA, ou seja, OSC-PLS-DA em comparação com apenas PLS-DA é a capacidade de OSC-PLS-DA em separar a variação preditiva da não-preditiva (ortogonal)²⁹. Portanto, o OSC corrige a matriz de dados \mathbf{X} , removendo as informações que não estejam relacionadas com a matriz \mathbf{Y} . O primeiro passo do algoritmo utilizado para cálculo das

componentes OSC é ortogonalizar a primeira componente principal (CP₁) da matriz \mathbf{X} em relação a \mathbf{Y} :

$$\mathbf{t}_{\text{OSC}} = \mathbf{t} - \mathbf{Y}(\mathbf{Y}^T \mathbf{Y})^{-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{t} \quad \text{Eq. 18}$$

em que, \mathbf{t}_{osc} é ortogonal a \mathbf{Y} , \mathbf{t} representa o vetor dos escores das amostras em CP₁.

Os vetores pesos (*weight*) \mathbf{w}_{osc} são calculados com uma regressão PLS de \mathbf{t}_{osc} , contra \mathbf{X} que minimiza a covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Os pesos então são utilizados para atualizar o vetor ortogonal dos escores, que é novamente ortogonalizado em relação a \mathbf{Y} , e assim por diante até a convergência. O vetor atualizado será aproveitado para calcular o vetor correspondente aos *loadings* (\mathbf{p}_{osc})^{28,30}, conforme Eq. 20.

$$\mathbf{t}_{\text{osc}} = \mathbf{X} \mathbf{w}_{\text{osc}} \quad \text{Eq. 19}$$

$$\mathbf{p}_{\text{osc}} = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{t}_{\text{osc}}}{(\mathbf{t}_{\text{osc}}^T \mathbf{t}_{\text{osc}})} \quad \text{Eq. 20}$$

A matriz \mathbf{X} é corrigida então através da subtração da variação que é ortogonal à matriz \mathbf{Y} :

$$\mathbf{X}_{\text{osc}} = \mathbf{X} - \mathbf{t}_{\text{osc}} \mathbf{p}_{\text{osc}}^T \quad \text{Eq. 21}$$

em que, \mathbf{X}_{osc} corresponde à matriz dos dados corrigidos, \mathbf{X} é a matriz dos dados originais, \mathbf{t}_{osc} o vetor dos escores e \mathbf{p}_{osc} o vetor dos *loadings*³¹.

Resolução de Curvas Multivariadas (MCR)

A primeira descrição sobre resolução de curvas multivariadas (do inglês, *Multivariate Curve Resolution* - MCR) foi em 1971 por Lawton e Sylvester³². O método foi testado para resolver os espectros de dois componentes em misturas de corantes fotográficos, na ausência de informações prévias. O método denominado de Resolução de Curva de Auto-Modelagem (do inglês, *Self-Modeling Curve Resolution* - SMCR) utilizou os autovetores da matriz de correlação de \mathbf{X} e uma restrição de não negatividade para se obter as estimativas das contribuições individuais dos corantes utilizando uma matriz de rotação³²⁻³³. Mais tarde o teste foi realizado e aprovado com a mistura de três componentes³⁴.

Grande parte das amostras analisadas apresenta-se na forma de misturas implicando em respostas instrumentais complexas, devido as diferentes substâncias que as compõem. Nesses casos, extrair dados de componentes puros torna-se uma tarefa difícil. Uma alternativa para resolver esse tipo de problema é a aplicação do método por MCR. Esse método descreve um conjunto de técnicas que se propõem à recuperação dos perfis (espectrais, de pH, temporais, de eluição, etc.) dos constituintes de uma mistura. Isso é realizado pela determinação de contribuições individuais das espécies químicas, mesmo sem nenhuma informação prévia disponível sobre a natureza e a composição dessas misturas³⁵. A principal premissa dessa família de técnicas é que os dados podem ser descritos por um método linear, como à Lei de Beer-Lambert para misturas, ou seja, quando os dados têm uma relação linear com a concentração³³:

$$\mathbf{A} = \mathbf{A}_1 + \mathbf{A}_2 + \dots + \mathbf{A}_n = \varepsilon_1 \mathbf{bc}_1 + \varepsilon_2 \mathbf{bc}_2 + \dots + \varepsilon_n \mathbf{bc}_n \quad \text{Eq. 22}$$

em que, \mathbf{A} são as absorvâncias das diferentes espécies, ϵ_n a absorvidade molar da n -ésima espécie no comprimento de onda considerado; b o caminho óptico e c_n a concentração da n -ésima espécie. A união das absorvâncias forma uma nova matriz \mathbf{D} .

O método MCR busca decompor uma matriz de dados \mathbf{D} ($r \times c$), em que as linhas r são os números de espectros armazenados através do processo e as colunas c são as variáveis instrumentais, como por exemplo, absorvância nos diferentes comprimentos de ondas. A decomposição MCR da matriz \mathbf{D} é executada de acordo com a Eq. 23^{33, 36}:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 23}$$

em que, em que \mathbf{C} ($r \times n$), é a matriz descrita como a contribuição de n espécies envolvidas no processo, que são espectroscopicamente ativas, variam nas diferentes r linhas da matriz de dados (perfis de concentração). \mathbf{S}^T ($n \times c$) é a matriz descrita como resposta instrumental das n espécies envolvidas que variam nas diferentes colunas c da matriz de dados (perfis de espectros puros). \mathbf{E} ($r \times c$) é a matriz residual com a variância não explicada pelo produto $\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ ³⁶.

Isso pode ser realizado com n amostras analisadas simultaneamente a partir de uma matriz de dados como representado na Eq. 24³⁷⁻³⁸:

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_1 \\ \mathbf{D}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{D}_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \mathbf{C}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{C}_n \end{bmatrix} \mathbf{S}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1 \\ \mathbf{E}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{E}_n \end{bmatrix} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 24}$$

Além de o sinal analítico obedecer a uma relação semelhante à lei de Beer-Lambert, outra condição é a análise do posto da matriz de dados dos analitos puros e das misturas.

A análise do posto (do inglês, *rank*) da matriz, que indica o número de espécies presentes na mistura, pode ser estimada pela porcentagem de variância explicada por Decomposição em Valores Singulares (do inglês, *Singular Value Decomposition - SVD*)³⁹, dando origem aos valores singulares, superiores aos relacionados com o ruído³⁹. As estimativas iniciais dos constituintes da matriz, \mathbf{S}^T , são obtidas a partir de métodos baseados na detecção de variáveis "puras"⁴⁰. O cálculo por mínimos quadrados alternantes (do inglês, *Alternating Least Squares - ALS*), proposto pelo grupo do professor Dr. Romà Tauler³³, busca o resultado que apresenta o melhor ajuste. Esse processo de otimização permite recuperar de perfis de concentrações individuais e sinais de espécies que melhor explicam a variância dos dados observados³⁹.

Uma vez que a estimativa inicial é gerada, a etapa de otimização iterativa é iniciada. Em cada ciclo iterativo as matrizes \mathbf{C} e \mathbf{S}^T são calculadas, sob restrições, em duas etapas, por mínimos quadrados³⁹⁻⁴²:

$$\mathbf{C} = \mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1} \quad \text{Eq. 25}$$

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T\mathbf{D} \quad \text{Eq. 26}$$

Uma matriz \mathbf{D}^* reconstruída a partir do produto das matrizes $\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ é calculada e comparada com a matriz \mathbf{D} original, onde a otimização iterativa continua até que o critério de convergência seja cumprido. Esse critério é alcançado quando a variação dos resultados entre iterações consecutivas apresentar valor abaixo do valor limite predefinido ou quando certo número de iterações for excedido⁴².

Certas restrições devem ser aplicadas durante os passos de otimização para fornecer formas significativas para os perfis \mathbf{C} e \mathbf{S}^T e para minimizar os fenômenos de ambiguidade de rotação ou intensidade, tanto quanto possível. As restrições são propriedades químicas ou matemáticas que os perfis em \mathbf{C} e/ou \mathbf{S}^T devem cumprir. Os perfis calculados são modificados de modo a obedecer à condição de restrição⁴². Em MCR-ALS qualquer tipo de restrição como a não-negatividade, unimodalidade, fechamento (*closure*), posto local e trilinearity, pode ser facilmente aplicada às soluções apontadas³⁷. Neste estudo foram utilizadas apenas as restrições de não-negatividade e unimodalidade (quando necessário). A não-negatividade é aplicável em dados de concentrações e instrumental que naturalmente devem ser positivos para terem significado físico. Portanto se um dado perfil deve ser não-negativo, os elementos negativos são forçados a serem iguais a zero. Já a unimodalidade permite que os perfis tenham um único máximo⁴⁴.

Neste trabalho as ferramentas quimiométrica descritas foram aplicadas de acordo com o objetivo de cada capítulo.

REFERÊNCIAS

- ¹DUNN, W.B., ELLIS, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 285-294, 2005.
- ²WHO - World Health Organization: *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*. WHO, Munich, Geneva; 1991.
- ³FDA - Food and Drug Administration. *Guidance for Industry-Botanical Drug Products*, p. 1-48, 2004.
- ⁴EMEA - European Agency for the Evaluation of Medicinal. *Products Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products*, p. 1-7, 2001.
- ⁵MIRANDA, J.I. *Processamento de imagens digitais: práticas usando Java*. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2011. 400 p.
- ⁶PEREIRA, E.B.B.; PEREIRA, M.B. Um critério para o descarte de variáveis na análise de componentes principais. *Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra*, Seropédica, v. 23, p. 1-7, 2004.
- ⁷SENA, M.M.; POPPI, R.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, v. 23, 2000.
- ⁸BARRO NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, v. 29, p.1401-1406, 2006.
- ⁹BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. Quimiometria. *Química Nova*, v. 8, p. 84-99, 1985.
- ¹⁰REIS, C.; ANDRADE, J.C. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia de papel. *Química Nova*, 19, p. 313-319, 1996.
- ¹¹BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4a ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2010.
- ¹²VOINOVICH, D.; CAMPISI, B.; PHAN-TAN-LUU, R. Experimental design for mixture studies. In: Steven D. Brown, Romà Tauler, Beata Walczak (Eds.): *Comprehensive chemometrics. Chemical and biochemical data analysis*. Elsevier Science Ltd., 2009. p. 247–250. 1.v.
- ¹³WOLD, S. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, 1987. p. 37-52.
- ¹⁴ESBENSEN, K.H.; GELADI, P. Principal component analysis: concept, geometrical interpretation, mathematical background, algorithms, history, practice. In: Steven D. Brown, Romà Tauler, Beata Walczak (Eds.): *Comprehensive chemometrics. Chemical and biochemical data analysis*. Elsevier Science Ltd., 2009. p. 211-227. 2.v.

- ¹⁵MARQUES, J.M.; MARQUES, M.A.M. As componentes principais no descarte de variáveis em um modelo de regressão múltipla. *Revista FAE*, v. 8, p. 93-101, 2005.
- ¹⁶SABIN, J.G.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, 2004.
- ¹⁷MOITA NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, v. 21, p.467-469, 1998.
- ¹⁸VALDERRAMA, P. *Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo*. 2005. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- ¹⁹REYMENT, R.; JÖRESKIG, K.G. *Applied factor analysis in the natural sciences*. 2. ed. Ed. Cambridge:Cambridge University Press, 1996. 371 p.
- ²⁰TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research*, v. 6, p. 469-479, 2007
- ²¹BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, v. 17, p. 166-173, 2003
- ²²ALMEIDA, M.R.; CORREA, D.N.; ROCHA, W.F.C.; SCAFI, F.J.O.; POPPI, R.J. Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation. *Microchemical Journal*, v. 109, p. 170-177, 2013
- ²³MORELLATO, S. A. *Modelos de regressão PLS com erros heteroscedásticos*. 2010. 49f. Dissertação (Mestrado em Estatística) - Departamento de Estatística, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- ²⁴WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 58, p. 109-130, 2001.
- ²⁵WOLD, S; JOHANSSON, E.; COCCHI, M. PLS: partial least squares projections to latent structures. In: Kubinyi H, editor. *3D QSAR in drug design: theory methods and applications*. Leiden, The Netherlands: Escom Science Publishers; 1993. p. 523-550.
- ²⁶TERRA, L.A.; FILGUEIRAS, P.R.; TOSE, L.V.; ROMÃO, W.; SOUZA, D.D.; CASTRO, E.V.R.; OLIVEIRA, M.S.L.; DIAS, J.C.M.; POPPI, R.J. Petroleomics by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry coupled to partial least squares with variable selection methods: prediction of the total acid number of crude oils. *Analyst*, v. 139, p. 4908-4916, 2014.
- ²⁷MATOS, G.D.; PEREIRA-FILHO, E.R.; POPPI, R.J.; ARRUDA, M.A.Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analytica*, n. 6, p. 38-50, 2003.
- ²⁸WOLD, S.; ANTTI, H.; LINDGREN, F.; ÖHMAN, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 44, p. 175-185, 1998.

- ²⁹BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, v. 20, p. 341-351, 2006.
- ³⁰HONORATO, F.A.; BARROS NETO, B.; MARTINS, M.N.; GALVÃO, R.K.H.; PIMENTEL, M.F. Transferência de calibração em métodos multivariados. *Química Nova*, v. 30, p.1301-1312, 2007.
- ³¹BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M. Model Based Preprocessing and Background Elimination: OSC, OPLS, and O2PLS. . In: Steven D. Brown, Romà Tauler, Beata Walczak (Eds.): *Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis*. Elsevier Science Ltd., 2009. p. 129-139. 2.v.
- ³²LAWTON, W.H. & SYLVESTRE, E.A. Self-modeling curve resolution. *Technometrics*, v. 13, p. 617-633, 1971.
- ³³RUTAN, S.C.; JUAN, A.; TAULER, R. Introduction to Multivariate Curve Resolution. In: Steven D. Brown, Romà Tauler, Beata Walczak (Eds.): *Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis*. Elsevier Science Ltd., p. 249–259, 2009. 2.v.
- ³⁴BORGEN, O.S.; KOWALSKI, B.R. An extension of the multivariate component-resolution method to three components. *Analytical Chimica Acta*, v. 174, p. 1-26, 1985.
- ³⁵TAULER, R. Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics*, v. 15, p. 627-646, 2001.
- ³⁶GARRIDO, M.; RIUS, F.X.; LARRECHI, M.S. Multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 390. p. 2056-2066, 2008.
- ³⁷TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Systems*, v. 30, p. 133-146, 1995.
- ³⁸TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSK, B. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics*, v. 9, p. 31-58, 1995.
- ³⁹MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINA, G.L.; POPPI, R.J.; TAULER, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações. *Química Nova*, v. 37, p. 1525-1532, 2014.
- ⁴⁰CARNEIRO, R.L.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J.; TAULER, R. Multivariate curve resolution of pH gradient flow injection mixture analysis with correction of the Schlieren effect. *Analyst*, v. 133, p. 774-783, 2008.
- ⁴¹WINDIG, W. Self-modeling mixture analysis of spectral data with continuous concentration profiles. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.16, p. 1-16, 1992.

⁴²JAYARAMAN, A.; MAS, S.; TAULER, R.; JUAN, A. Study of the photodegradation of 2-bromophenol under UV and sunlight by spectroscopic, chromatographic and chemometric techniques. *Journal of Chromatography B*, v. 910, p. 138-148, 2012.

⁴³GONÇALVES, R.P.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. Thermal edible oil evaluation by UV-Vis spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, v. 163, p. 83-86, 2014.

⁴⁴JUAN, A.; RUTAN, S.C.; TAULER, R. Two-way data analysis: multivariate curve resolution - iterative resolution methods. In: Steven D. Brown, Romà Tauler, Beata Walczak (Eds.): *Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis*. Elsevier Science Ltd., p. 325-344, 2009. 2.v.



CAPÍTULO III



DISCRIMINAÇÃO ENTRE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Camellia sinensis* DE PRIMEIRA E SEGUNDA COLHEITA POR ESPECTROMETRIA UV-VISÍVEL E OSC-PLS-DA

INTRODUÇÃO

No processo de fabricação do chá verde as folhas frescas picadas, manual ou mecanicamente, são submetidas ao cozimento a vapor (processo usado no Japão) ou torradas em forno (processo mais usado na China) para que a oxidação, comumente conhecido por fermentação, seja interrompida, preservando os componentes ativos das folhas. Nesse procedimento as folhas tornam-se mais flexíveis e maleáveis e então são colocadas em bandejas aquecidas, com o intuito de romper a estrutura celular, inativando a enzima e conseqüentemente inibindo a fermentação¹⁻⁵. Esse termo não se refere a um processo microbiano, mas sim a reação de acastanhamento natural catalisada por enzimas endógenas para a planta⁶. Em seguida, as folhas são submetidas à prensagem e aquecimento com uma série de tratamentos chamada de rolamento primário, secundário e rolamento final⁷. Isso dá as folhas a sua forma e estilo, tais como torcido, encaracolado ou enrolado, assim como uma maior durabilidade. O rolamento das folhas também ajuda a regular a liberação de substâncias naturais e sabores durante a maceração. Existem dois tipos principais de chá verde o Sencha e o Banha⁸. Sencha é produzido com folhas da primeira colheita, chamado de ichibanha, sendo de qualidade superior e o Banha é feito a partir das folhas de colheita tardia ou com as folhas mais duras e talos que não são aproveitadas para a produção de Sencha.

No Brasil, a colheita das folhas da *C. sinensis* começa em setembro. Primeiramente, os arbustos são totalmente podados e após duas semanas, com o desenvolvimento dos brotos, as primeiras folhas são colhidas e é o que chamamos

–folhas de primeira colheita”. Num espaçamento de aproximadamente duas semanas, as –folhas de segunda colheita” são coletadas e assim sucessivamente até meados do mês de abril, o que permite cerca de doze colheitas durante esse período.

Os metabólitos exercem uma grande variedade de funções fisiológicas e ecológicas nas plantas. No caso do chá verde, além disso, fornece efeitos benéficos à saúde humana. Esses efeitos têm sido atribuídos à complexa composição química do chá verde que é constituído por compostos fenólicos (catequinas entre outros), compostos voláteis, aminoácidos, carboidratos, proteínas, mineiras, oligoelementos, etc

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), conforme Figura 1, é o principal alcaloide purina encontrado no chá verde, representando cerca de 3 a 6% do peso seco das folhas¹²⁻¹³. Existem duas hipóteses sobre a importância da cafeína nas plantas: defesa química e função alelopática. A primeira hipótese confere às folhas jovens um maior teor de cafeína para proteger os tecidos moldes de patógenos e herbívoros. Já a segunda hipótese atribui a ela o efeito autotóxico, ou seja, quando as folhas caem no chão, a libera inibindo a germinação de outras plantas^{12,14}. O consumo desse alcaloide aumenta o estado de alerta e reduz a fadiga¹⁵. Ademais, possui efeitos diuréticos¹⁶ e é considerado um fraco broncodilatador¹⁷. No entanto, segundo Lovatto et al. (2004)¹⁸ o consumo diário de cafeína pode aumentar a pressão arterial para consumidores regulares¹⁸ e mulheres grávidas devem limitar seu consumo em 300 mg dia⁻¹, evitando assim aborto espontâneo ou ainda que o bebê nasça com baixo peso¹⁹.

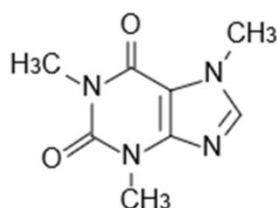


Figura 1 – Fórmula estrutural da cafeína.

Além dos compostos já citados, as folhas de chá também contêm pigmentos que são lipofílicos como, por exemplo, as clorofilas a e b²⁰. Estudo realizado por Lee et al. (2015)²¹ sugere que o calor aplicado na manufatura do chá verde pode ativar a enzima clorofilase e assim aumentar a concentração da feofitina. Segundo Harpaz-Saad et al. (2007)²², essa enzima é responsável pela degradação da clorofila. Além do mais, a conversão de clorofila em feofitina pode ocorrer no processamento e armazenamento de vegetais verdes²³. A análise da decomposição da clorofila e seus derivados têm sido investigados por estar relacionada à qualidade dos produtos como frutas e vegetais²⁴. Apesar da feofitina conferir uma coloração mais escura no processo de obtenção do chá verde, estudos revelam que esse derivado possui atividades antioxidantes, assim como antígenotóxica²⁵⁻²⁶. As Figuras 2a e 2b, apresentam as fórmulas estruturais das clorofilas a e b, assim como das feofitinas a e b.

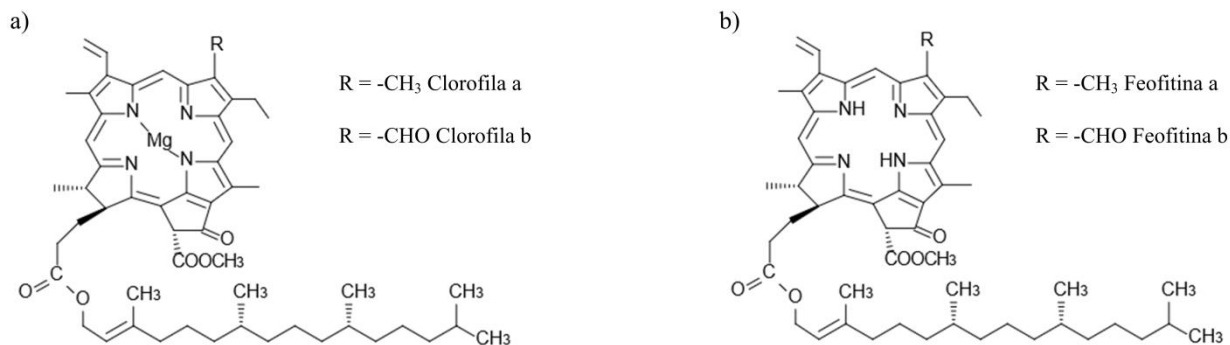


Figura 2 – Fórmula estrutural (a) clorofila a e b. (b) feofitina a e b.

A composição das folhas de chá verde é muito semelhante à das folhas antes de serem colhidas. No entanto, isso depende de uma variedade de fatores como clima, estação, técnicas de cultura, tipo, idade da planta e também o processamento das folhas²⁷⁻²⁸. A variação da quantidade dos metabólitos referente às colheitas das folhas do chá verde também vem sendo estudada²⁹⁻³⁰, porém necessita ser mais investigada.

Estudos utilizando técnicas instrumentais mais rápidas e simples como espectrometria ultravioleta-visível, infravermelho e infravermelho próximo, associada às técnicas quimiométrica, têm sido realizados como alternativas para a análise discriminante e/ou classificatória entre café cafeinado e descafeinado³¹; classificação de azeites de oliva virgens de diferentes regiões geográficas e autenticidade³²⁻³³, assim como vinhos³⁴, variedades de vinagres³⁵, variedades de chá³⁶, entre outros. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial da impressão digital por espectrometria na região do UV-Visível associado à análise multivariada dos dados na discriminação das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita.

METODOLOGIA

Amostragem

As amostras da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, já processadas, foram fornecidas pela Fazenda Agrochá Boa Vista, localizada na cidade de Araucária (PR). Neste mesmo local foi coletado, em triplicata, o material para o processo de conferência de exsicata. A exsicata da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina e classificada pela Dra. Ana Odete Vieira sob o número FUEL 49288, conforme Figura 3.

Dois conjuntos de amostras de folhas de *C. sinensis* foram estudados nesta etapa. O primeiro foi coletado em setembro de 2011 e corresponde às folhas de primeira colheita após a poda. Dezoito dias depois, o segundo conjunto de folhas foi coletado, quando os novos brotos estavam prontos para serem colhidos e correspondem à segunda colheita. No laboratório essas amostras secadas foram trituradas em um liquidificador

(modelo TA-02 da marca Skymssen) para obter homogeneidade e armazenadas em sala climatizada a 20° C.



Figura 3 - Foto da exsicata da planta *Camellia sinensis* (L.) Kuntze depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina sob o número FUEL 49288.

Determinação da Umidade

Essa análise refere-se a segurança do produto, pois ambientes úmidos favorecem a contaminação e conseqüentemente a degradação do material por micro-organismos. Para essa análise³⁷, primeiramente os pesa-filtros permaneceram por 40 minutos em estufa (modelo S150S-D da marca Biopar) a 105° C. A massa do material vegetal utilizada foi de 3,000 g, em triplicata, utilizando a balança analítica modelo AY220 da Shimadzu. O material vegetal foi mantido na estufa durante 3 horas a 105°C. Após esse período, as amostras foram resfriadas em dessecador. Na seqüência suas massas foram

verificadas e então as amostras retornaram para a estufa por mais 30 minutos. Esse procedimento foi repetido até massa constante. Os cálculos da porcentagem de umidade foram obtidos por meio da Eq. 1.

$$U(\%) = \frac{N}{P} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

sendo que, N corresponde ao valor, em grama, de umidade (perda da massa) e P o valor, em grama, da amostra.

Determinação das Cinzas Totais

A determinação do teor de cinzas avalia a presença de resíduos inorgânicos não voláteis como areia, pedra e terra. Para essa determinação³⁷ foram analisados 2,000 g do material vegetal, nos pesa-filtros previamente preparados e em triplicata. Com auxílio do bico de Bunsen as amostras foram pré-incineradas e na sequência mantidas durante 12 horas no forno mufla (modelo MA385 da marca Marconi) a temperatura de 550° C. Após esse intervalo, foram resfriadas em dessecador e suas massas verificadas. Em seguida, as amostras retornaram para a mufla por 1 hora e as massas foram novamente verificadas. O procedimento foi repetido até massa constante³⁷. Os cálculos obtidos da porcentagem de cinzas totais foram realizados por meio da Eq. 2.

$$C_T(\%) = \frac{N}{P} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

em que, N corresponde ao valor, em grama, de cinzas e P o valor, em grama, da amostra.

Preparo dos Extratos Brutos

Para a extração dos metabólitos, todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico e obtidos a partir de F. Maia (São Paulo, Brasil). Os solventes extratores dos metabólitos foram escolhidos de acordo com um planejamento de misturas do tipo centroide simplex³⁸ para quatro componentes, Figura 4. Os quatro solventes foram etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c), totalizando quinze diferentes misturas, com três replicatas no ponto central para o cálculo de erro experimental, conforme Tabela 1. A seleção de cada solvente foi feita considerando triângulo seletividade de solventes de Snyder³⁹.

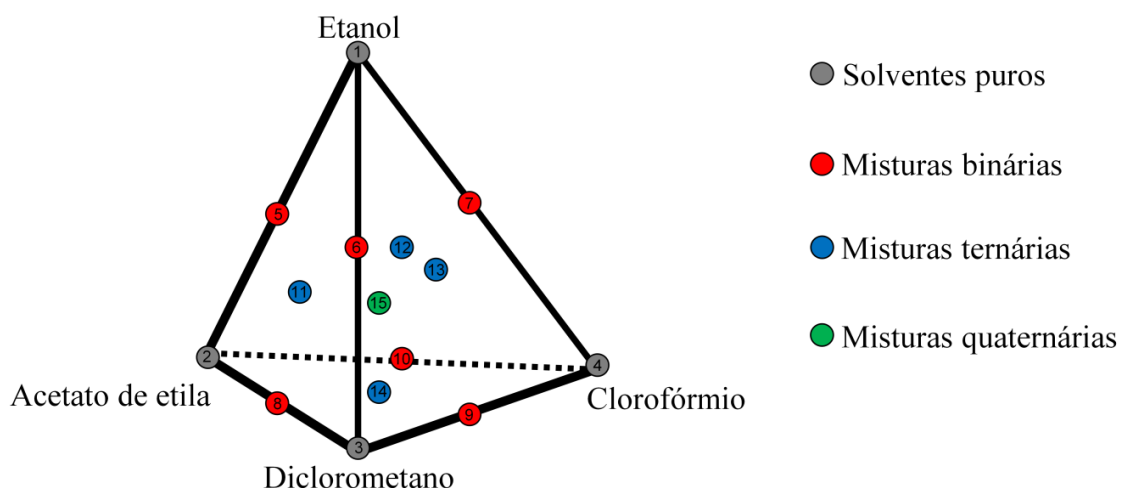


Figura 4 - Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo (e) etanol, (a) acetato de etila, (d) diclorometano e (c) clorofórmio.

Neste trabalho, optou-se pelo método de remaceração, ou seja, repetindo a operação algumas vezes utilizando o mesmo material, renovando o líquido extrator. Esse procedimento foi realizado no banho ultrassom, que facilita a dilatação e hidratação do material vegetal. Conseqüentemente, isso causa o alargamento dos poros da parede celular, facilitando a transferência de massa e permitindo que uma maior quantidade de compostos seja extraída⁴⁰. Portanto, cada extrato bruto foi obtido a partir

de 2,00 g de material vegetal, anteriormente moído e peneirado, com adição de 6 mL de uma das misturas de solventes listadas na Tabela 1. Na sequência, cada mistura permaneceu no banho ultrassom (modelo Ultracleaner 800 da marca Unique) durante 30 minutos e posteriormente filtrada para separar a solução a partir das folhas. Esse procedimento foi repetido mais catorze vezes, de modo que o volume total de solvente puro ou mistura adicionada às folhas foi de 90 mL. Os extratos foram deixados em repouso, sob ventilação forçada, até atingirem massa constante.

Tabela 1 – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c).

Notação do extrato	Solventes			
	Etanol (e)	Acetato de etila (a)	Diclorometano (d)	Clorofórmio (c)
e	1	0	0	0
a	0	1	0	0
d	0	0	1	0
c	0	0	0	1
ea	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
ed	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	0
ec	$\frac{1}{2}$	0	0	$\frac{1}{2}$
ad	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
ac	0	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
dc	0	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
ead	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0
edc	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$
eac	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
adc	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
eadc(1)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
eadc (2)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
eadc (3)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$

Análise por Espectrometria na região do UV-Visível

Para a análise por espectrometria UV-Visível, 20 mg de cada extrato bruto foram dissolvidos em 10,00 mL da respectiva mistura extratora, Tabela 1. As medidas de absorção foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1 cm, por meio de um espectrofotômetro UV-Visível e monitorados na faixa de 200 a 800 nm com resolução de 1 nm.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos brutos das amostras da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e bomba quaternária Termo-Electron Corporation.

Para as análises cromatográficas, 2 mg de cada extrato bruto foram redissolvidos em 2,00 mL de metanol grau HPLC adquirido da JT Baker (Phillipsburg, EUA) e filtrados em membrana de polifluoretano (PTFE) com 25 mm de diâmetro e porosidade de 0,2 µm da Chromafil (Düren, Alemanha). Sendo que 100 µL da solução foram diluídos em 400 µL da fase móvel inicial, ou seja, 95% de acetonitrila (ACN) e 5% de água (H₂O) (v/v), onde a acetonitrila foi adquirida pela JT Baker (Phillipsburg, EUA). As condições cromatográficas foram: coluna cromatográfica Hilic Phenomenex modelo Kinetex com dimensões de 150 x 4,60 mm e porosidade de 2,6 µm acoplada ao filtro de linha. Volume de injeção de 20 µL e a vazão de 0,7 mL min⁻¹. A fase móvel do sistema cromatográfico se deu pela combinação da seguinte programação: 95,00:5,00 de ACN:H₂O (v/v) durante 1 min; 80,65:19,35 ACN:H₂O (v/v) até 4 min; 64,50:35,50 ACN:H₂O (v/v) até 7 min; 50,00:50,00 ACN:H₂O (v/v) até 10 min e retornando a

95,00:5,00 ACN:H₂O (v/v) até 15 minutos. O arranjo de fotodiodo foi monitorado na faixa de absorvância de 190 a 800 nm.

Programas Computacionais

Os dados obtidos nas análises por espectrometria UV-Visível foram monitorados e registrados pelo *software* Vision Lite e as análises cromatográficas pelo ChromQuest 4.2.

Para o tratamento dos dados foram utilizados os programas computacionais STATISTICA^{®41} e Matlab^{®42}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros básicos do controle de qualidade das folhas da *C. sinensis* foram averiguados pela porcentagem de umidade e o teor de cinzas totais. Segundo a Portaria 519, de 26 de junho de 1998 da ANVISA⁴³, o limite da porcentagem de umidade para as folhas do chá verde é de 12%. Assim, os resultados obtidos permaneceram abaixo da legislação vigente, ou seja, 6,73 % ($\pm 0,04$) e 7,05 % ($\pm 0,03$), para as folhas de primeira e segunda colheita, respectivamente. Quanto ao teor de cinzas totais, os valores resultantes foram de 4,28% ($\pm 0,09$) para a primeira colheita e 4,24% ($\pm 0,09$) para a segunda colheita, abaixo do limite estabelecido de 8%⁴³.

Os rendimentos dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita obtidos de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex (Tabela 1) foram avaliados e estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimentos dos extratos brutos, das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, provenientes da mistura de solventes seguindo o planejamento do tipo centroide simplex entre etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c).

Notação do extrato	Rendimentos (% (m/m))	
	1ª colheita	2ª colheita
e	4,6836	4,7026
a	1,9291	1,8577
d	3,2569	2,7896
c	2,0597	1,2637
ea	4,3546	7,2531
ed	6,1169	5,6358
ec	5,5389	5,4138
ad	2,3243	1,9180
ac	2,5650	2,2766
dc	1,6581	1,7993
ead	3,4534	4,3341
eac	3,6671	4,6245
edc	4,6792	4,6199
adc	0,9844	0,9641
eadc (1)	3,5980	3,7376
eadc (2)	3,6898	3,6214
eadc (3)	3,5479	3,7472

O teste t-emparelhado foi aplicado aos valores dos rendimentos a fim de verificar se haveria diferença entre as porcentagens dos rendimentos dos extratos brutos das duas colheitas. Para isso utilizou-se a equação 3³⁶:

$$\hat{t} = \frac{|\bar{d} - \Delta|}{s_d / \sqrt{N}} \quad \text{Eq. 3}$$

em que, \hat{t} representa o valor de $t_{\text{calculado}}$ para ser comparado ao t_{tabelado} , \bar{d} é o valor médio das diferenças d (diferença individual entre dois valores em um único par combinado, ou seja, a diferença entre as porcentagens de rendimentos de dois extratos brutos, de primeira e segunda colheita, extraídos com o mesmo solvente extrator), Δ assumindo a

hipótese de que valor médio das diferenças d para a população é igual à zero, s_d representa o desvio padrão e N o número de pares de dados.

O resultado do teste t-emparelhado mostrou que não há diferença significativa ao nível de 95% nas porcentagens dos rendimentos entre as colheitas, onde o valor de $t_{\text{calculado}}$ de 0,71 foi menor que t_{tabelado} de 2,12. Portanto, não rejeitamos a hipótese nula, ou seja, não há evidências estatísticas de que os resultados de primeira e segunda colheita são significativamente diferentes. Dessa maneira, todos os valores das porcentagens dos rendimentos foram analisados em conjunto.

A fim de avaliar o efeito dos solventes puros e suas misturas com relação aos rendimentos dos extratos brutos, Tabelas 2, foram testados diferentes modelos matemáticos. A análise da variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a adequação desses modelos. Para os resultados dos rendimentos dos extratos o melhor modelo que se ajustou aos dados foi o quadrático, demonstrando ser significativo e não apresentando falta de ajuste num nível de 95% de confiança. Como o valor da razão $Mq_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$, que corresponde ao valor de $F_{\text{calculado}}$ (2,47), é menor do que o valor tabelado $F_{5,19;0,05}$ de 2,74; não houve falta de ajuste para o modelo. Além disso, o valor da razão MQ_R/MQ_T (19,68) foi maior que o valor da distribuição tabelada $F_{(9,24;0,05)}$ de 2,30, no nível de 95% de confiança, indicando que o modelo ajustado é significativo, conforme Tabela 3. O coeficiente de determinação (R^2) para esse ajuste foi calculado pela razão da soma dos quadrados da regressão e total (SQ_R/SQ_T) sendo igual a 0,8359. Já o valor máximo que R^2 poderia explicar é dado pela subtração da soma quadrática total e do erro puro e este valor dividido pela soma quadrática total $(SQ_T - SQ_{\text{ep}})/SQ_T$, nesse caso 0,8807.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo quadrático das porcentagens dos rendimentos dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, preparados de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F _{calculado}
Regressão (R)	70,2867	9	7,8096	19,6837
Resíduos (r)	9,5222	24	0,3968	
F. Ajuste (faj)	3,7547	5	0,7509	2,4738
E. puro (ep)	5,7675	19	0,3036	
Total (T)	79,8088	33	2,4184	

A Eq. 4 mostra o modelo de predição das porcentagens dos rendimentos dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis*, onde os termos que não apresentaram significância foram omitidos.

$$\begin{aligned} \text{Rend}_{(m/m)} = & 4,83e + 2,11a + 3,16d + 1,79c \\ & (\pm 0,44) \quad (\pm 0,44) \quad (\pm 0,44) \quad (\pm 0,44) \\ & + 7,21ea + 6,53ed + 7,85ec - 4,26ad - 3,87dc \\ & (\pm 1,87) \quad (\pm 1,87) \quad (\pm 1,87) \quad (\pm 1,87) \quad (\pm 1,87) \end{aligned} \quad \text{Eq. 4}$$

em que, (e) etanol, (a) acetato de etila, (d) diclorometano, (c) clorofórmio e os valores entre parênteses os erros padrão dos parâmetros. No restante desse trabalho todas as demais equações apresentadas seguem essa mesma notação para os coeficientes. Os termos que não apresentaram significância no nível de 95% de confiança foram omitidos.

Por meio dos coeficientes da Eq. 4, podemos observar o efeito sinérgico entre as misturas binárias envolvendo etanol, ou seja, etanol:acetato de etila; etanol:diclorometano e etanol:clorofórmio. Já as interações entre acetato de etila:diclorometano e diclorometano:clorofórmio apresentaram um efeito antagônico. O componente acetato de etila foi igualado à zero para representar a superfície de resposta em duas dimensões, conforme Figura 5. A superfície indica que a maior porcentagem

dos rendimentos pode ser obtida pela mistura envolvendo etanol:diclorometano e a menor porcentagem por meio da mistura diclorometano:clorofórmio, onde utilizando a regressão obtemos 5,63 e 1,51 % (m/m), respectivamente.

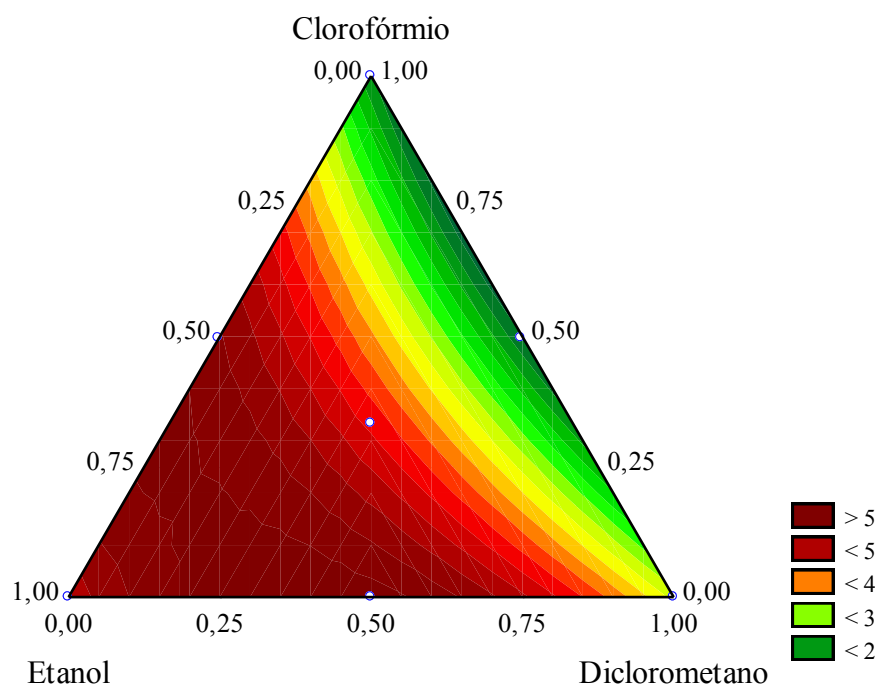


Figura 5 - Superfícies de resposta dos rendimentos dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, mostrando o efeito dos solventes extratores do planejamento experimental do tipo centroide simplex.

Os espectros de absorção dos extratos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita foram registrados na faixa de 200 a 800 nm em seus respectivos solventes de extração. Porém, devido à interferência dos solventes utilizados, os espectros foram analisados a partir de 250 nm a 720 nm, onde após este último comprimento de onda não houve informações espectrais adicionais.

Para a análise por PLS-DA os dados foram organizados numa matriz com 34 linhas e 471 colunas. Cada linha refere-se ao espectro do extrato bruto correspondente (Tabela 1), de ambas as colheitas e as colunas às absorbâncias nos diferentes comprimentos de onda, envolvendo a região de 250 a 720 nm. A Figura 6 ilustra a

sobreposição dos espectros de absorção dos 34 extratos brutos, sendo 17 para cada colheita.

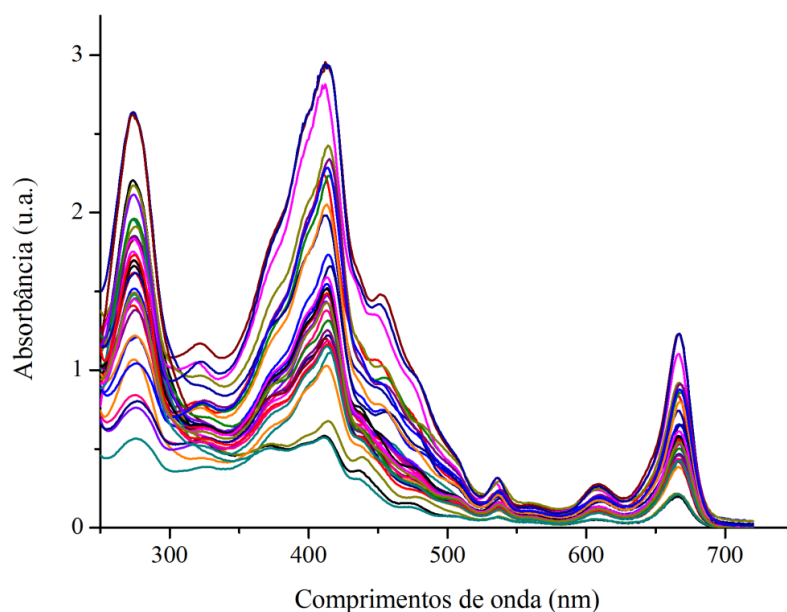


Figura 6 – Sobreposição das impressões digitais espectrais na região do UV-Visível dos extratos brutos, obtidos pelo planejamento experimental do tipo centroide simplex, das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita.

PLS-DA foi utilizado para tentar encontrar a melhor correlação entre as matrizes **X** e **Y**. Nesse conjunto de dados, a matriz **X** corresponde aos espectros de absorção dos extratos brutos da *C. sinensis* e **Y** às classes de cada espectro, ou seja, primeira ou segunda colheita. Para obter uma melhor análise discriminante alguns pré-processamentos foram testados. Por fim a matriz **X** foi centrada na média e a redução da variação da matriz **X**, que não estava relacionada à **Y** (autoescalado), foi realizada aplicando a correção do sinal ortogonal (OSC). O método de validação cruzada venezianas (do inglês, *venetian blinds*) foi utilizado para a determinação do número de variáveis latentes (VL) com o menor valor da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (do inglês, *Root Mean Square Error of Cross-Validation - RMSECV*). Nesse caso, são necessárias duas variáveis latentes (VL) para explicar o método de classificação, o que representa 96,33% da variância explicada em **X** e 66,38

% da variância explicada em Y , com RMSECV igual a 0,41. Por meio da Figura 7, que apresenta o gráfico dos escores das VL_1 x VL_2 , podemos observar dois grandes grupos, ou seja, primeira e segunda colheita.

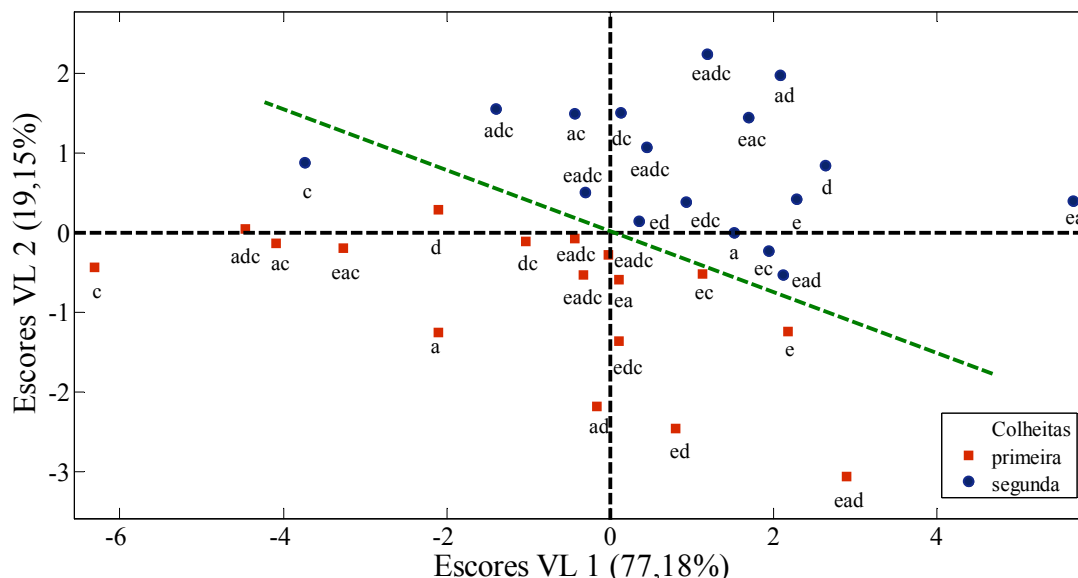


Figura 7 – Gráfico dos escores da OSC-PLS-DA (VL_1 vs. VL_2) das impressões digitais espectrais na região de UV-Visível (250 a 720 nm) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, obtidos pelo planejamento experimental do tipo centroide simplex.

O gráfico dos pesos (*weight*), Figura 8a, mostra as bandas que contribuem para a discriminação entre as duas colheitas. No entanto, as regiões espectrais que podem ser consideradas como importantes para o desempenho do modelo de OSC-PLS-DA e consequentemente na discriminação entre as colheitas, são observadas no gráfico que ilustra a importância da Variável na Projeção (do inglês, *Variable Importance of Projection - VIP*)⁴⁴⁻⁴⁵, com valores maiores que 1, Figura 8b. Esse último gráfico indica três bandas: 272; 410 e 663 nm. A maior parte dos extratos de segunda colheita está localizada no quadrante positivo da VL_1 . Com os pesos dessas três absorções foram positivos na VL_1 , então quanto mais para a direita do gráfico dos escores (mais positivo), maior será a concentração dos metabólitos que correspondem a essas bandas. Os valores dos pesos negativos da VL_2 , que corresponde a 48,56 % da variação

explicada em \mathbf{Y} , indicam que os extratos de primeira colheita contêm menores concentrações do metabólito referente à banda em 272 nm e com isso alocados na região negativa da VL₂. Já os valores positivos dessa mesma variável demonstram a influência das bandas em 410 e 663 nm nas amostras de segunda colheita.

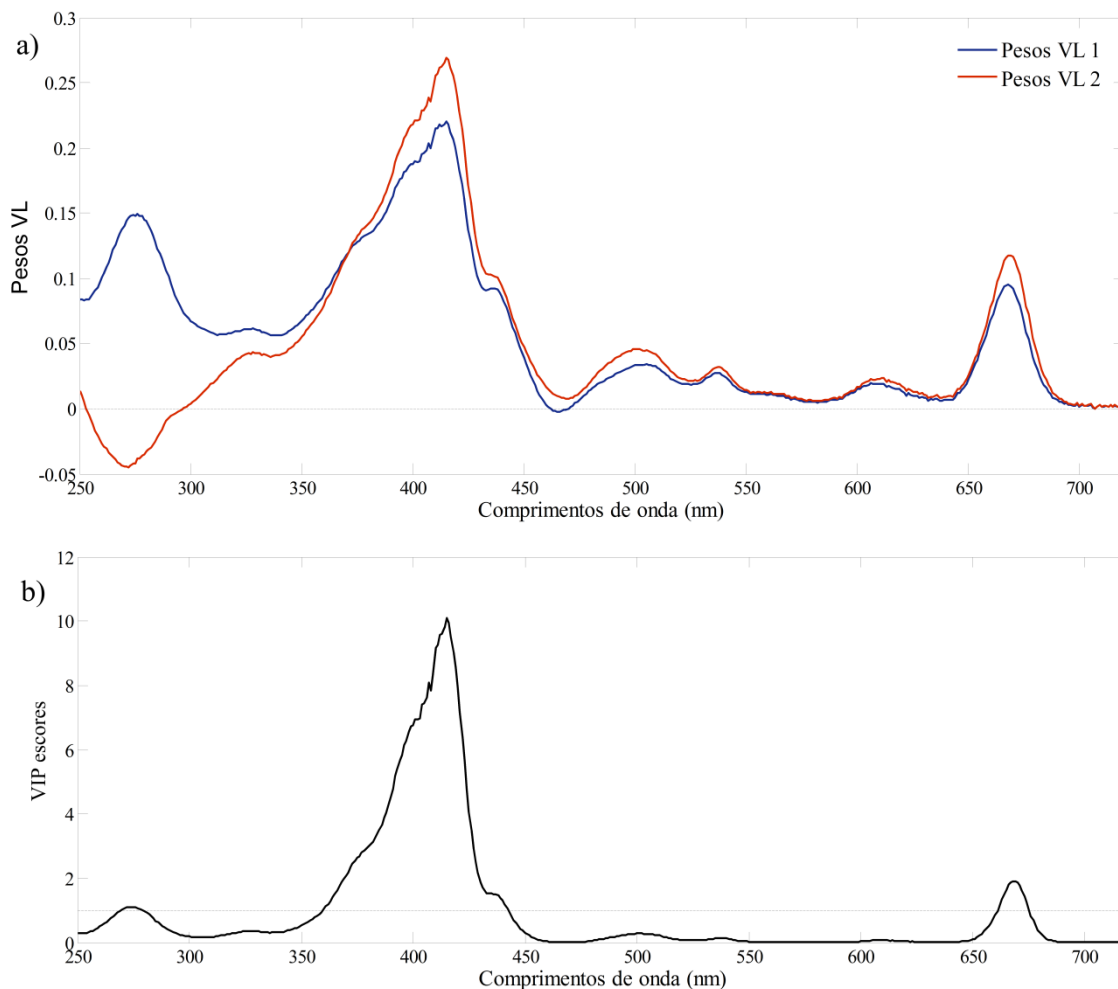


Figura 8 – (a) Gráficos dos escores dos pesos (*weight*) das variáveis latentes (VL) 1 (azul) e 2 (vermelho). (b) Importância da Variável na Projeção (VIP) para a investigação da impressão digital espectral na região UV-Visível (250 a 720 nm) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita modelados por OSC-PLS-DA.

No caso do chá verde a região de 272 nm pode estar associada à cafeína ou ao grupo das catequinas. Porém, segundo Souto e colaboradores (2010)³¹ esta região pode ser devida à transição eletrônica da cafeína $n \rightarrow \pi^*$, em particular ao cromóforo C=O. As outras duas bandas indicadas podem ser correspondentes a pigmentos presentes nas

folhas da *C. sinensis*. A feofitina é um produto de degradação da clorofila a, que é encontrada no chá e possui a banda de Soret em 410 nm (região azul), seguida por outras bandas mais fracas e de comprimentos de onda maiores, chamadas bandas Q em 665 nm, onde entre as bandas Soret e Q, há pequenas bandas em 505, 535 e 606 nm²⁴. Essas bandas são características do anel porfirico e ocorre pela promoção de elétrons do π ligante para π^* antiligante⁴⁶. Portanto, pela avaliação aplicando OSC-PLS-DA, possivelmente a discriminação entre os dois grupos se deve as maiores concentrações da cafeína e o maior produto de degradação da clorofila a, feofitina a, nos extratos brutos de segunda colheita quando comparadas com os de primeira colheita.

Para obter mais informações sobre os metabólitos sugeridos na discriminação por OSC-PLS-DA, os extratos brutos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à detecção por arranjo de diodo (DAD). Em cada extrato bruto obteve-se nos ápices dos picos da cafeína e da feofitina a, os perfis espectrais, conforme as Figuras 9a e 9b, com absorvâncias máximas em 272 e 410 nm, respectivamente.

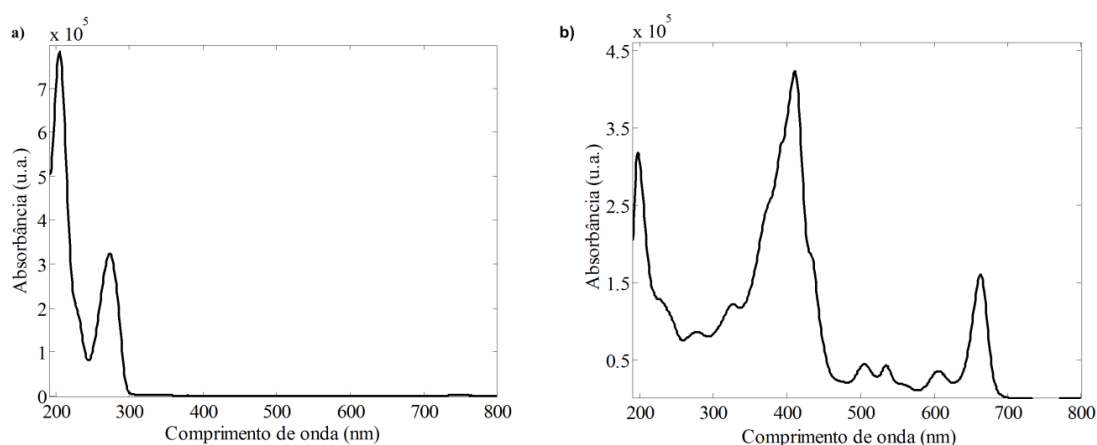


Figura 9 – Espectros UV-Visível obtidos a partir da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD): **(a)** cafeína com pico máximo no tempo de eluição de 2,54 min. **(b)** feofitina a com pico máximo no tempo de eluição de 1,52 min.

Na Tabela 4 constam os valores das intensidades das bandas das absorvâncias máximas da cafeína e feofitina a. Segundo Milenkovic et al. (2012)²⁴ a razão entre as intensidades das absorvâncias envolvendo as bandas Soret e Q ($A_{\text{Soret}}/A_{\text{Q}}$) para a feofitina a e b são de aproximadamente 2,33 e 5,30, respectivamente. As razões médias das intensidades dessas bandas, obtidas em nossos experimentos, foram de $2,49 \pm 0,09$ para os extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira colheita e $2,45 \pm 0,18$ (u.a.) para os de segunda, sugerindo mais uma vez a presença da feofitina a.

Tabela 4 – Valores das intensidades das absorvâncias máximas dos perfis espectrais da cafeína e feofitina a dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, obtidos pelo planejamento experimental do tipo centroide simplex.

Notação do solvente	Intensidade da Cafeína $\lambda_{\text{máx}}$ 272 nm		Intensidade da Feofitina a $\lambda_{\text{máx}}$ 410 nm	
	1ª colheita	2ª colheita	1ª colheita	2ª colheita
e	323,8	576,1	411,7	672,7
a	251,2	257,8	1495,6	1709,3
d	600,7	1100,4	1549,4	2505,7
c	267,4	294,6	1396,6	2056,1
ea	328,0	671,4	944,5	925,4
ed	355,2	804,1	805,2	1795,9
ec	395,5	449,2	1233,7	879,4
ad	228,5	433,8	1564,7	1077,8
ac	176,5	219,7	1123,4	1578,4
dc	247,8	334,8	1083,4	1218,0
ead	330,7	459,4	311,8	1264,8
eac	347,2	289,6	1402,3	965,6
edc	527,1	466,3	1161,4	924,8
adc	192,1	214,9	1348,7	1981,1
eadc (1)	317,8	445,1	1177,1	1556,6
eadc (2)	241,2	383,3	1005,1	1338,8
eadc (3)	282,3	379,0	1070,6	1402,7

O teste t-emparelhado foi aplicado aos valores das intensidades da absorvância da cafeína e feofitina a, conforme Tabela 4. Os resultados do teste t mostraram diferença significativa, ao nível de 95%, entre as abundâncias relativas de dados das intensidades dos espectros, tanto para a cafeína quanto para a feofitina a nas duas colheitas. Essa afirmação está baseada nos respectivos valores de $t_{\text{calculado}}$ de 3,51 e 2,43 maiores que t_{tabelado} de 2,12. Portanto, há evidências estatísticas de que os resultados de primeira e segunda colheita são significativamente diferentes, sendo maiores para os extratos de segunda colheita. Segundo Mohanpuria et al. (2009)¹³ a cafeína se encontra presente nas folhas mais jovens. Assim como a cafeína, a feofitina a apresentou resultados maiores para os extratos de segunda colheita. O fato de haver ocorrido um segundo estresse na planta relacionado ao corte das folhas, pode nos levar a crer que possa haver desencadeado maior produção de cafeína e clorofila e seus derivados. Esses resultados confirmam os obtidos por espectrometria na região UV-Visível descrito anteriormente.

Para analisar o comportamento dos solventes quanto à extração da cafeína e da feofitina a, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada sobre as intensidades das absorvâncias em 272 e 410 nm, conforme Tabela 4. Para isso, foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico especial e a falta de ajuste das superfícies foram avaliadas pela ANOVA, no nível de 95% de confiança. Para os resultados das absorvâncias máximas da cafeína obtidos a partir dos extratos brutos das amostras de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita o modelo quadrático foi significativo e não apresentou falta de ajuste. Os modelos matemáticos estão representados pelas equações 5 e 6.

$$\text{Cafeína}_{1^{\text{a}} \text{ colheita}} = 310,57e + 252,92a + 588,60d + 256,51c - 769,61ad$$

$(\pm 68,15)$ $(\pm 68,15)$ $(\pm 68,15)$ $(\pm 68,15)$
 $(\pm 290,18)$

Eq. 5

$$\text{Cafeína}_{2^{\text{a}} \text{ colheita}} = 593,41e + 276,71a + 1106,66d + 301,37c - 1184,70ad - 1435,85dc$$

$(\pm 72,56)$ $(\pm 72,56)$ $(\pm 72,56)$ $(\pm 72,56)$ $(\pm 308,92)$ $(\pm 308,92)$

Eq. 6

A Tabela 5 mostra a ANOVA para os modelos quadráticos ajustados às respostas experimentais das intensidades das absorvâncias máximas do perfil espectral da cafeína nos extratos brutos de ambas as colheitas da *C. sinensis*.

Tabela 5 – Resultados da análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos quadráticos das intensidades espectrais de cafeína das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, preparados de acordo com o planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F _{calculado}
Cafeína 1^a colheita				
Regressão (R)	161732,07	9	17970,23	3,76
Resíduos (r)	33451,53	7	4778,79	
F. Ajuste (faj)	30512,52	5	6102,50	4,15
E. puro (ep)	2939,01	2	1469,50	
Total (T)	195183,60	16	12198,97	
Cafeína 2^a colheita				
Regressão (R)	792958,02	9	88106,45	16,27
Resíduos (r)	37911,97	7	5416,00	
F. Ajuste (faj)	35176,32	5	7035,26	5,14
E. puro (ep)	2735,65	2	1367,82	
Total (T)	830869,98	16	51929,37	

Para os modelos quadráticos ajustados aos valores das intensidades de absorvância máxima de cafeína dos extratos brutos de primeira e segunda colheita, as razões MQ_{faj}/MQ_{ep} , foram respectivamente 4,15 e 5,14. Esses valores são menores do que o valor da distribuição $F_{(5,2;0,05)}$ tabelado de 19,30; indicando não haver falta de ajuste para os modelos selecionados. Além disso, os valores da razão MQ_R/MQ_T foram

de 3,76 e 16,27, respectivamente, sendo maiores quando comparados ao valor da distribuição $F_{(9,7;0,05)}$ tabelado de 3,68; indicando que a regressão foi significativa.

Analisando os coeficientes do modelo obtido para os extratos de primeira colheita da *C. sinensis*, verifica-se que houve um efeito antagônico entre a interação do solvente envolvendo acetato de etila:diclorometano quanto à extração da cafeína, Eq. 5. O mesmo ocorreu para a extração desse composto nos extratos de segunda colheita. Porém, para essa amostra também houve um efeito antagônico entre diclorometano:clorofórmio, Eq. 6. De acordo com os coeficientes dos extratos de primeira e segunda colheita, o diclorometano apresentou os maiores valores prevendo uma absorvância máxima no perfil espectral da cafeína de 588,6 e 1106,7, respectivamente. Esses valores possuem boa concordância com os valores experimentais de 600,7 e 1100,4.

As Figuras 10a e 10b mostram as superfícies de resposta para os modelos ajustados das absorvâncias máximas para a cafeína dos extratos brutos de primeira e segunda colheita, respectivamente. O componente clorofórmio foi igualado à zero para representar a superfície de resposta em duas dimensões. Podemos observar, que em ambas as colheitas, as maiores intensidades das absorvâncias são obtidas pelo diclorometano puro e as menores nas interações entre acetato de etila:diclorometano. Os resultados para diclorometano são confirmados pela literatura, onde estudos testando diversos solventes mostram que este solvente é mais eficiente na extração da cafeína⁴⁷⁻
⁴⁹. Ademais, é também utilizado como solvente na descafeinação de chá⁴⁸.

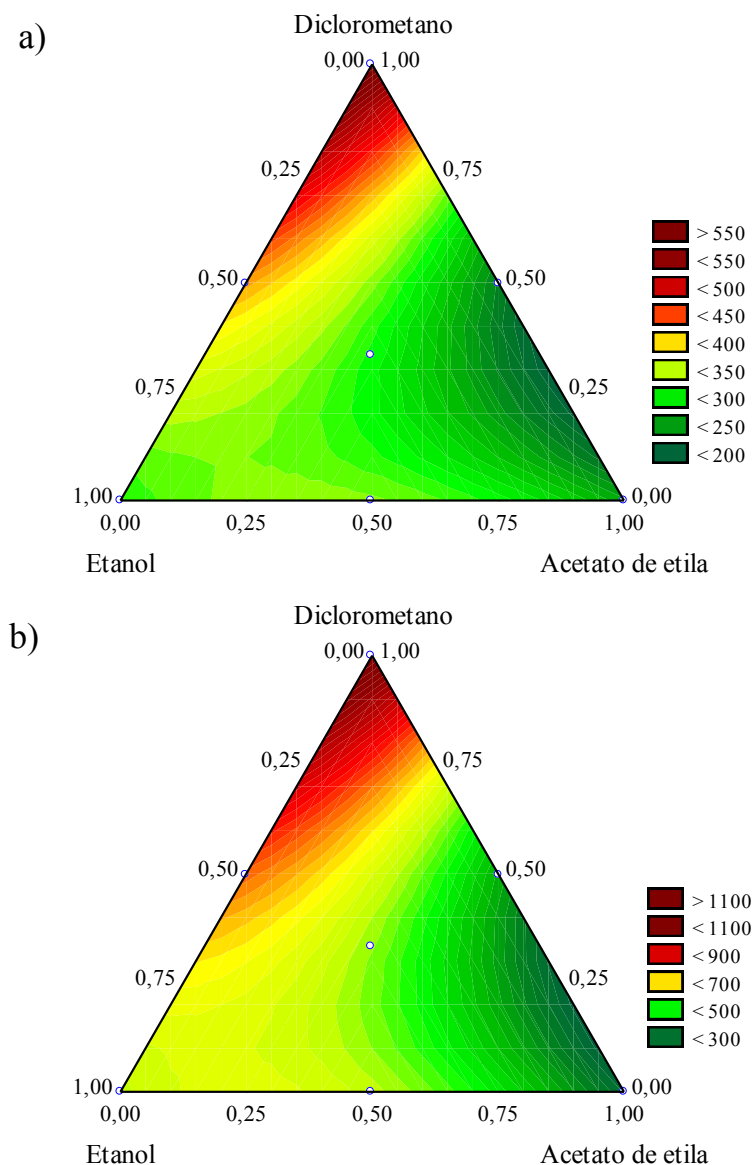


Figura 10 - Superfícies de resposta para os componentes: etanol, acetato de etila e diclorometano aplicadas as absorvâncias máximas da cafeína dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira (a) e segunda (b) colheita, mostrando o efeito dos solventes extratores do planejamento experimental do tipo centroide simplex.

Para os resultados das intensidades da absorvância máxima da feofitina a (410 nm), obtidas a partir dos extratos brutos das amostras da *C. sinensis* de primeira e segunda, o modelo cúbico especial foi o que melhor se ajustou aos dados. Considerando que os valores de F reportados na Tabela 6 de 0,58 e 0,59, respectivamente, foram menores que o valor da distribuição $F_{(1, 2; 0,05)}$ tabelado de 18,51, não houve falta de

ajuste para o modelo selecionado, num nível de 95% de confiança. Além disso, os valores da razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo (MQ_R/MQ_r), foram de 24,10 e 27,50, respectivamente, sendo maiores quando comparados ao valor da distribuição $F_{(13, 3; 0,05)}$ tabelado de 8,73, indicando que a regressão foi significativa.

Tabela 6 – Resultados da análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos quadráticos das intensidades espectrais de feofitina a das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, preparados de acordo com o planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F _{calculado}
Feofitina a 1ª colheita				
Regressão (R)	2031793,41	13	156291,80	24,10
Resíduos (r)	19452,34	3	6484,11	
F. Ajuste (faj)	4380,17	1	4380,17	0,58
E. puro (ep)	15072,17	2	7536,08	
Total (T)	2051245,75	16	128202,86	
Feofitina a 2ª colheita				
Regressão (R)	3865591,50	13	297353,19	27,50
Resíduos (r)	32434,79	3	10811,60	
F. Ajuste (faj)	7366,37	1	7366,37	0,59
E. puro (ep)	25068,42	2	12534,21	
Total (T)	3898026,29	16	243626,64	

Os modelos matemáticos de previsão para a determinação da intensidade das absorvâncias máximas da feofitina a para os extratos brutos de primeira e segunda colheita estão representados pelas equações 7 e 8, respectivamente.

$$\begin{aligned}
 \text{Feofitina a}_{1^{\text{a}} \text{ colheita}} &= 412,67e + 1496,57a + 1550,37d + 1397,52c \\
 &\quad (\pm 80,51) \quad (\pm 80,51) \quad (\pm 80,51) \quad (\pm 80,51) \\
 &+ 1283,42ec - 1325,56ac - 1593,15dc \\
 &\quad (\pm 392,20) \quad (\pm 392,20) \quad (\pm 392,20) \\
 &- 19988,02ead + 9148,92eac \\
 &\quad (\pm 2498,24) \quad (\pm 2498,24)
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 7}$$

$$\text{Feofitina a}_{2^{\text{a}} \text{ colheita}} = \underset{(\pm 103,97)}{673,95e} + \underset{(\pm 103,97)}{1710,56a} + \underset{(\pm 103,97)}{2506,96d} + \underset{(\pm 103,97)}{2057,36c} \\ - \underset{(\pm 506,43)}{1985,23ec} - \underset{(\pm 506,43)}{4164,01ad} - \underset{(\pm 506,43)}{4296,80dc} + \underset{(\pm 3226,01)}{27101,26adc} \quad \text{Eq. 8}$$

Analisando os coeficientes do modelo obtido para os extratos de primeira colheita podemos notar a existência de um efeito sinérgico entre a mistura binária envolvendo etanol:clorofórmio e ternária de etanol:acetato de etila:clorofórmio, ou seja, fornecem resultados maiores de intensidade do que se esperaria. Os resultados previstos para essas duas interações foram 1225,7 e 1434,1 e os resultados experimentais foram 1225,7 e 1403,3, respectivamente. Já a interação entre as misturas de solventes extratores de acetato de etila:clorofórmio; diclorometano:clorofórmio e etanol:acetato de etila:diclorometano tiveram um efeito antagônico nas intensidades de absorvância máxima de feofitina a. A maior intensidade de absorvância máxima em 410 nm obtida foi por meio do diclorometano, onde utilizando a regressão o valor previsto foi de 1550,4; concordando com o valor experimental de 1549,4. O mesmo ocorreu para a amostra de segunda colheita, onde a intensidade prevista da absorvância da feofitina a extraída por diclorometano seria de 2557,4 e o valor obtido experimentalmente foi de 2505,7. Quanto às interações dos solventes dos extratos brutos de segunda colheita acetato de etila:diclorometano:clorofórmio extraíram uma maior quantidade da feofitina a do que poderia se esperar, assim tendo um efeito sinérgico. Já as misturas binárias envolvendo etanol:clorofórmio; acetato de etila:diclorometano e diclorometano:clorofórmio tiveram um efeito antagônico na extração do composto discutido.

As superfícies de resposta para os modelos ajustados das absorvâncias máximas do perfil espectral da feofitina a dos extratos brutos de primeira e segunda colheita estão

demonstradas nas Figuras 11a e 11b, respectivamente. O componente acetato de etila foi igualado à zero para representar a superfície de resposta em duas dimensões. Podemos observar nas superfícies que a parte vermelha mais escura, indo em direção ao diclorometano e clorofórmio, fornecem elevadas intensidades das absorbâncias máximas da feofitina a e no vértice do etanol, em verde escuro, indicam baixas intensidades, em ambas as colheitas.

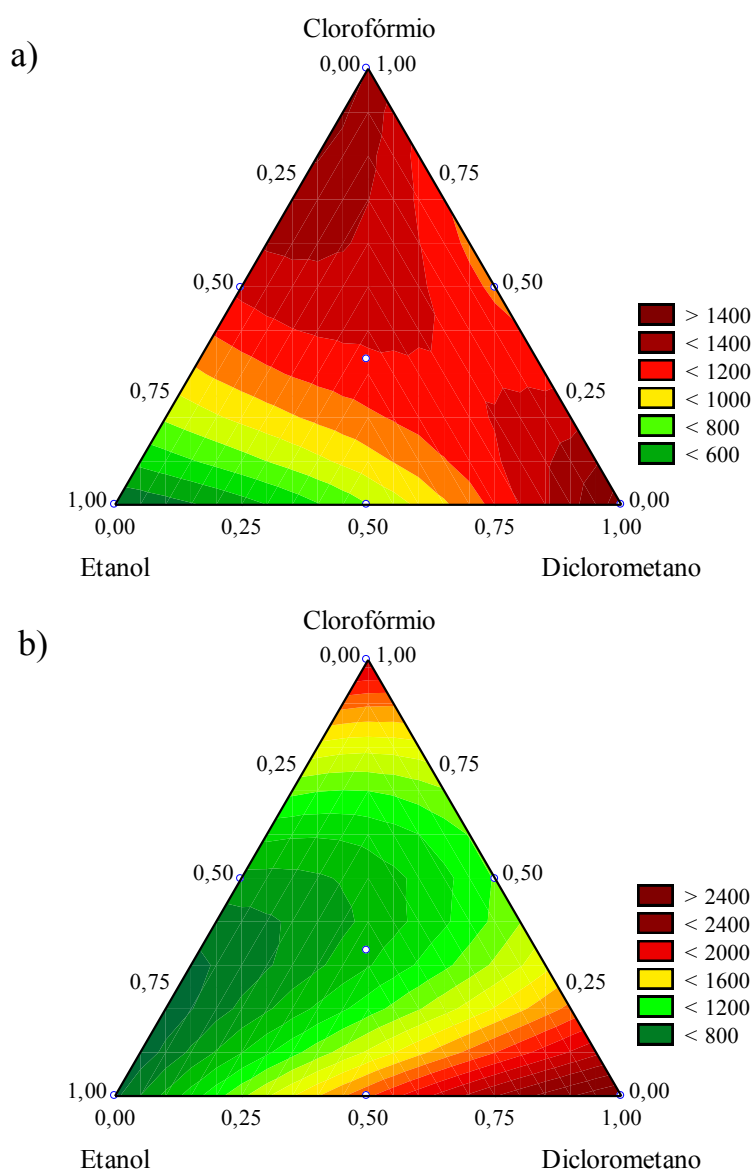


Figura 11 - Superfícies de resposta para os componentes: etanol, acetato de etila e diclorometano aplicadas as aborbâncias máximas da feofitina a dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primera colheita **(a)** e segunda **(b)** colheita, mostrando o efeito dos solventes extratores do planejamento experimental do tipo centroide simplex.

CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou o potencial da impressão digital obtidas por espectrometria na região UV-Visível em discriminar as folhas de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita com o auxílio da ferramenta quimiométrica adequada. A vantagem de se utilizar a espectrometria é atribuída à facilidade de manuseio e obtenção dos dados, além de ser de baixo custo e simples. Além disso, a impressão digital dos extratos brutos foi útil para fazer uma análise exploratória dos dados espectrais dos extratos brutos em conjunto com o método quimiométrico OSC-PLS-DA. Assim, foi possível distinguir as amostras de primeira e segunda colheita, mesmo havendo grande variação dos dados devido aos diferentes solventes utilizados na preparação dos extratos brutos utilizando o planejamento do tipo centroide simplex explorando quatro solventes diferentes. Os valores dos VIPs indicaram que as absorbâncias correspondentes à cafeína e feofitina foram as responsáveis pela distinção entre as colheitas. O diclorometano puro foi o melhor extrator para esses metabólitos.

Esses resultados sugerem que a metodologia proposta é uma alternativa para a avaliação das amostras de primeira e segunda colheita, uma vez que as folhas da *C. sinensis* de primeira colheita possui um valor de mercado maior. Trabalhos futuros poderiam investigar a impressão digital espectral aliada ao método de PLS-DA de outras plantas, assim como outras variáveis, além do corte.

REFERÊNCIAS

- ¹PAGANINI-COSTA, P., SILVA, D.C. Uma xícara (chá) de química. *Revista Vistual de Química*, v. 3, p. 27-36, 2011.
- ²RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidant capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, v. 110, p. 852-858, 2008.
- ³SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G.A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.Y.; DASHWOOD, R.H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, v. 495, p. 61-74, 2001.
- ⁴WAN, X.; LI, D.; ZHANG, Z. Green tea and black tea: Manufacturing and consumption. In: HO, C.T.; LIN, J.K.; SHAHIDI, F. (Eds). *Tea and tea products: Chemistry and health-promoting properties*. New York: CRC Press, 2008. p. 1-8.
- ⁵WEISBURGER, J.H. Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters*, v. 114, p. 315-317, 1997.
- ⁶HARBOWY, M.E.; BALENTINE, D.A. Tea chemistry. *Critical Reviews in Plant Science*, v. 16, p. 415-480, 1997.
- ⁷ANAN, T. Changes of chemical compounds during green tea manufacturing. *Japan Agricultural Research Quarterly*, v. 22, p. 195-199, 1988.
- ⁸KAPOOR, M.P.; RAO, T.P.; OKUBO, T.; JUNEJA, L.R. History, processing techniques, principles, traditions, features, and attractions. In: JUNEJA, L.R.; KAPOOR, M.O.; OKUDO, T.; RAO, T.P. (Eds.). *Green Tea Polyphenols: Nutraceuticals of Modern Life*. Boca Raton: CRC Press, 2013. p. 1-18.
- ⁹CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial effects of green tea - A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 25, p. 79-99, 2006.
- ¹⁰GRAHAM, A. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, v. 21, p. 334-350, 1992.
- ¹¹SHARANGI, A.B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, v. 42, p. 529-535, 2009.
- ¹²ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, v. 69, p. 841-856, 2008.
- ¹³MOHANPURIA, P.; KUMAR, V.; YADAV, S.K. Tea Caffeine: metabolism, functions, and reduction strategies. *Food science and biotechnology*, v. 19, p. 275-287, 2010.

- ¹⁴MAUGHAN, R.J.; GRIFFING, J. Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, v. 16, p. 411-420, 2003.
- ¹⁵SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 1243-1255, 2002.
- ¹⁶NUSSBERGER, J.; MOSSER, V.; MARIDOR, G.; JUILLERAT, L.; WAEBER, B.; BRUNNER, H.R. Caffeine-induced diuresis and trial natriuretic peptides. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 15, p. 685-691, 1990.
- ¹⁷BARA, A.; BARLEY, E. Caffeine for asthma (review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* Art. No.: CD001112. DOI:10.1002/14651858.CD001112.
- ¹⁸LOVALLO, W.R.; WILSON, M.F.; VICENT, A.S.; SUNG, B.H.; McKEY, B.S.; WHITSETT, T.L. Blood pressure response to caffeine shows incomplete tolerance after short-term regular consumption. *Hypertension*, v., 43, p. 760-765, 2004.
- ¹⁹COT - Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products, and the Environment. *Statement on the reproductive effects of caffeine*. Disponível em: <http://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/cotstatementcaffeine200804.pdf>. Acesso em 30 de dezembro de 2014.
- ²⁰FRIEDMAN, M.; LEVIN, C.E.; CHOI, S.H.; LEE, S.U.; KOZUKUE, N. Changes in the composition of raw tea leaves from the Korean Yabukida plant during high-temperature processing to pan-fried Kamairi-cha green tea. *Journal of Food Science*, v. 74, p. C406-C412, 2009.
- ²¹LEE, J.; HWANG, Y.S.; KANG, I.K.; CHOUNG, M.G. Lipophilic pigments differentially respond to drying methods in tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *LWT - Food Science and Technology*, v. 61, p. 201-208, 2015.
- ²²HARPAZ-SAAD, S.; AZOULAY, T.; ARAZI, T.; TAAKOV, E.B.; METT, A.; SHIBOLETH, Y.M.; HÖRTENSTEINER, S.; GIDONI, D.; GAL-ON, A.; GOLDSCHMIDT, E.E.; EYAL, Y. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *The Plant Cell*, v. 19, p. 1007-1022, 2007.
- ²³SCHWARTZ, S.J.; LORENZO, T.V. Chlorophylls in food. *Food Science and Nutrition*, v. 29, p. 1-17, 1990.
- ²⁴MILENKOVIC, S.M.; ZVEZDANOVIC, J.B.; ANDELKOVIC, T.D.; MARKOVIC, D.Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*, v. 1, p. 16-24, 2012.

- ²⁵HIGASHI-OKAI, K.; TANIGUCHI, M.; OKAI, Y. Potent suppressive activity of pheophytin a and b from non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against the activation of oxygen radical generation, cytokine release and chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, p. 555-558, 1998.
- ²⁶HIGASHI-OKAI, K.; TANIGUCHI, M.; OKAI, Y. Potent antioxidative activity of non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) – association with pheophytins a and b. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 117-120, 2000.
- ²⁷CHOW, H.H.S.; HAKIM, I.A. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacological Research*, v. 64, p. 105-112, 2011.
- ²⁸MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 71, p.1698S-1702S, 2000.
- ²⁹ERCISLI, S., ORHAN, E., OZDEMIR, O., SENGUL, M., GUNGOR, N. Seasonal Variation of Total Phenolic, Antioxidant Activity, Plant Nutritional Elements, and Fatty Acids in Tea Leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis* clone Derepazari 7) Grown in Turkey Sezai. *Pharmaceutical Biology*, v., 46, p. 683-687, 2008.
- ³⁰YAO, L., CAFFIN, N., D'ARCY, B., JIANG, Y., SHI, J., SINGANUSONG, R., LIU, X., DATTA, N., KAKUDA, Y., XU, Y. Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Australia-Grown Tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 6477-6483, 2005.
- ³¹SOUTO, U.T.C.P.; PONTES, M.J.C.; SILVA, E.C.; GALVÃO, R.K.H.; ARAÚJO, M.C.U.; SANCHES, F.A.C.; CUNHA, F.A.S.; OLIVEIRA, M.S.R. UV-Vis spectrometric classification of coffees by SPA-LDA. *Food Chemistry*, v. 119, p. 368-371, 2010.
- ³²OUSSAMA, A.; ELABADI, F.; PLATIKANOV, S.; KZAIBER, F.; TAULER, R. Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy and PLS with variable importance of projection (VIP) scores. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 89, p. 1807-1812, 2012.
- ³³PIZARRO, C. RODRÍGUEZ-TECEDOR, S.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors. *Food Chemistry*, v. 138, p. 915-922, 2013.
- ³⁴AZCARATE, S. M.; CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, J. M. Classification of Argentinean sauvignon blanc wines by UV spectroscopy and chemometric methods. *Journal of Food Science*, v. 78, p. 432-436, 2013.

- ³⁵LIU, F.; HE, Y.; WANG, L. Determination of effective wavelengths for discrimination of fruit vinegars using near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 615, p. 10-17, 2008.
- ³⁶PALACIOS-MORILLO, A.; ALCÁZAR, A.; PABLOS, F.; JURADO, J. M. Differentiation of tea varieties using UV–Vis spectra and pattern recognition techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 103, p. 79-83, 2013.
- ³⁷INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Determinações Gerais. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ed. São Paulo, v.1, 1985.
- ³⁸BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4a ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2010.
- ³⁹SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*, 2nd ed., New York: Wiley, 1997.
- ⁴⁰VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 8, p. 303-313, 2001.
- ⁴¹**STATISTICA FOR WINDOWS**, Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 1999.
- ⁴²**MATLAB** version R2008b, The Mathworks Inc., Mathworks, Manson, MA, USA.
- ⁴³**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 519, de 26 de junho de 1998.
- ⁴⁴CHONG, I.G.; JUN, C.H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 78, p. 103-112, 2005.
- ⁴⁵WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 58, p. 109-130, 2001.
- ⁴⁶DIKIO, E.D.; ISABIRYE, D.A. Synthesis and oxidation of cobalt (II) pheophytin-a complex. *E-Journal of Chemistry*, v. 8, p. S297-S303, 2011. Disponível em: file:///C:/Users/Acer/Downloads/462915%20(2).pdf. Acesso em: 31 de dezembro de 2014.
- ⁴⁷ATOMSSA, T.; GHOLAP, A.V. Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using uv-visible spectrometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v. 5, p. 1-8, 2011.

⁴⁸BELAY, A.; TURE, K.; REDI, M.; ASFAW, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, v. 108, p. 310-315, 2008.

⁴⁹SHARIF, R.; AHMAD, S.W.; ANJUM, H.; RAMZAN, N.; MALIK, S.R. Effect of infusion time and temperature on decaffeination of tea using liquid-liquid extraction technique. *Journal of Food Process Engineering*, v. 37, p. 46-52, 2013.



CAPÍTULO IV



EFEITO DO SOLVENTE EXTRATOR NA OBTENÇÃO DA EPICATEQUINA, EPIGALOCATEQUINA GALATO, EPIGALOCATEQUINA E ANTIOXIDANTES NAS FOLHAS DE *Camellia sinensis* L. POR PLANEJAMENTO DE MISTURAS

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse no chá verde tem aumentado devido aos seus efeitos medicinais e farmacológicos atribuídos aos polifenóis especialmente catequinas e ácidos fenólicos. Os principais compostos das folhas da *C. sinensis* são a epigalocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) e epigalocatequina (EGC)¹. Essas catequinas são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente do chá verde e têm recebido considerável atenção por suas propriedades benéficas para a saúde tais como a prevenção de doenças cardiovasculares² e do câncer³⁻⁵, bem como suas propriedades anti-hipertensiva⁶⁻⁷, anti-inflamatório⁸, anti-obesidade⁹ e anti-envelhecimento¹⁰, entre outros.

Vários estudos sobre as catequinas no chá verde têm sido relatados, incluindo suas atividades antioxidantes¹¹⁻¹². Os antioxidantes são substâncias que atrasam ou inibem significativamente a oxidação de substâncias facilmente oxidáveis¹³. O metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos para a produção de energia no organismo humano utiliza o oxigênio e como consequência este se torna um radical livre altamente reativo. Radicais livres são capazes de atacar as células saudáveis do corpo, fazendo com que perca sua estrutura e função e assim contribuindo para o envelhecimento e doenças degenerativas como o câncer, cardiovascular, cataratas, declínio no sistema imunológico e disfunção cerebral. Esses radicais livres podem ser então neutralizados pelos antioxidantes¹⁴. No chá verde a EGCG possui capacidade de

reagir com a maioria das espécies reativas de oxigênio. A estrutura tri-hidróxi das catequinas contribuem para sua atividade antioxidante porque podem quelar íons metálicos e prevenir a geração de radicais livres. Além disso, essa estrutura permite a deslocalização de elétrons, o que confere alta reatividade para eliminar os radicais livres¹⁵.

O método mais utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de compostos e extratos específicos é realizado pela atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH[•]). Este método foi descrito por Brand-Williams et al. (1995)¹⁶ ao qual baseia-se na redução do DPPH[•] por uma substância antioxidante¹⁷, conforme Figura 1. O monitoramento é feito pela redução da banda de absorbância no comprimento de onda específico, conforme a reação ocorre.

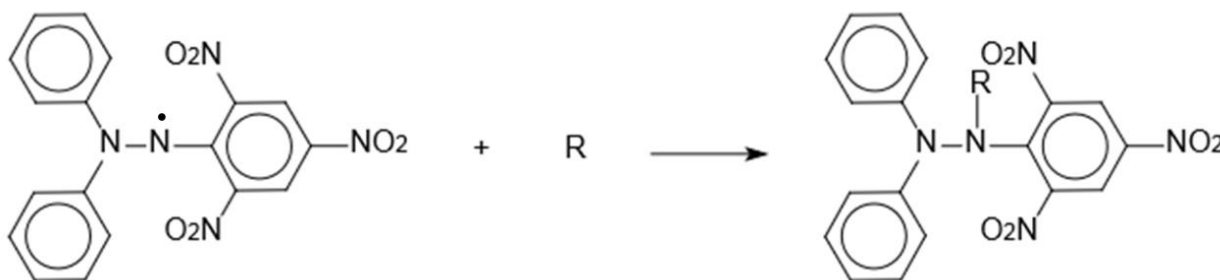


Figura 1 – Estabilização do radical livre DPPH[•].

O método de DPPH então foi modificado por Sánchez-Moreno et al. (1998)¹⁸ que mediu parâmetros cinéticos, sendo dois deles a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (IC₅₀) e o tempo que esta concentração necessita para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical.

Muitos métodos, tais como a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)¹⁹, espectrometria de reflectância de infravermelho próximo com transformada

de Fourier (FT-NIR)²⁰, cromatografia líquida capilar com detecção electroquímica¹¹⁻²¹, cromatografia em camada delgada²², cromatografia de precipitação centrífuga²³, cromatografia contracorrente de alta velocidade²⁴⁻²⁵, entre outros, foram relatados para a análise de conteúdo catequina no chá verde.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência envolve a interação dos componentes da amostra com a fase estacionária e a fase móvel²⁶. A escolha da fase móvel é fundamental, pois além de arrastar os componentes da amostra através do sistema cromatográfico ela participa do processo de separação. Portanto três critérios devem ser considerados na seleção da fase móvel, ou seja, características físico-químicas, força cromatográfica e seletividade²⁷.

Existe uma infinidade de solventes disponíveis para a seleção da composição da fase móvel. A seleção é geralmente afetada pelas características físico-químicas do solvente como a alta pureza, baixa viscosidade e ponto de ebulição, decomposição da fase móvel, compatibilidade com o detector, dissolução da amostra sem decompor os componentes e miscibilidade completa em misturas. Outros dois parâmetros devem ser levados em consideração, a força cromatográfica (polaridade) relacionada à retenção dos compostos e a seletividade relacionada à separação entre eles²⁷.

A fase móvel na cromatografia em fase reversa geralmente é composta de um ou mais modificadores orgânicos (solvente orgânico) e água. Assim o índice de polaridade é uma medida numérica da polaridade relativa dos solventes envolvidos, conforme Eq. 1²⁸. Os valores de polaridades individuais para os quatro solventes mais utilizados na cromatografia líquida em fase reversa, ou seja, água, metanol, acetonitrila e tetra-hidrofurano, são: 10,2; 5,1 e 5,8 e 4,0²⁹; respectivamente.

$$P_{ab}' = \Phi_a P_a + \Phi_b P_b \quad \text{Eq. 1}$$

onde, P_a' e P_b' são os índices de polaridade dos solventes puros A e B e ϕ_a e ϕ_b as frações dos volumes dos solventes A e B.

Além da polaridade Snyder³⁰, determinou experimentalmente três parâmetros: basicidade (xe), acidez (xd) e momento de dipolo (xn). Os solventes então foram agrupados, Tabela 1, de acordo com o tipo de interação que eles possuem, este agrupamento é disposto em um triângulo, Figura 2. Portanto, solventes quimicamente semelhantes, possuem parâmetros de seletividade similares, onde fazem parte do mesmo grupo, mesmo podendo apresentar valores diferentes de polaridade.

Tabela 1 – Classificação dos solventes determinados por Snyder.

Grupos	Solventes
I	Éteres alifáticos (éter dietílico)
II	Álcoois alifáticos (metanol, etanol, octanol, 1-propanol)
III	Derivados de piridina, (tetra-hidrofurano), sulfóxidos
IV	Glicóis, ácido acético
V	Diclorometano
VI	Ésteres alifáticos, cetonas, nitrilas, dioxano (acetonitrila)
VII	Hidrocarbonetos aromáticos, compostos aromáticos halogenados, éteres aromáticos, compostos nitro (tolueno)
VIII	Água

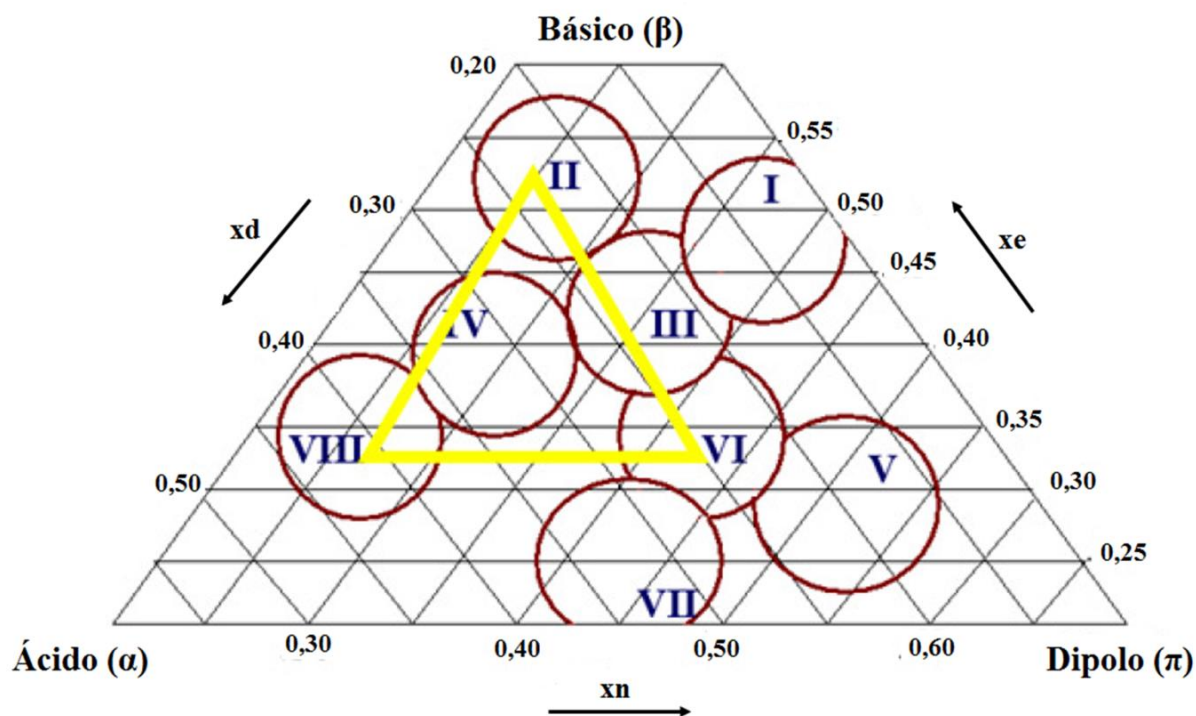


Figura 2 - Triângulo de seletividade de Snyder para solventes usados em cromatografia.

A força peso do solvente de uma fase móvel composta por água e modificadores orgânicos pode ser calculada pela Eq. 2:

$$S_{ab} = \Phi_a S_a + \Phi_b S_b \quad \text{Eq. 2}$$

onde, S_a e S_b são os valores força-peso dos solventes puros "a" e "b" e ϕ_a e ϕ_b as frações dos volumes dos solventes "a" e "b"²⁸.

Os parâmetros de força para os quatro solventes mais utilizados na cromatografia líquida em fase reversa, ou seja, água, metanol, acetonitrila e tetra-hidrofurano, são: 0,0; 2,6; 3,1 e 4,4³¹; respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de diferentes solventes na extração de epicatequina (EC), epigallocatequina galato (EGCG) e epigallocatequina

(EGC), bem como sobre as suas atividades antioxidantes em dois conjuntos de folhas da *C. sinensis* usando o planejamento de misturas do tipo centroide simplex para os solventes de etanol, diclorometano, acetato de etila e clorofórmio. Um planejamento experimental envolvendo mistura de água com diferentes modificadores orgânicos também foi utilizado para investigar diferentes fases móveis na separação de picos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). A análise de componente principal (ACP) foi então utilizada para comparar as impressões digitais cromatográficas para os diferentes extratos.

METODOLOGIA

Preparo das Amostras

Os extratos brutos foram preparados seguindo o planejamento de misturas do tipo centroide simplex envolvendo quatro solventes extratores: etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c), conforme Tabela 2. Cada extrato foi obtido a partir de 2,00 g de material vegetal, com adição de 6 mL de uma das misturas de solventes listadas na Tabela 2. Cada mistura permaneceu no banho ultrassom durante 30 minutos, onde na sequência foram filtradas. Esse procedimento foi repetido mais catorze vezes, de modo que o volume total de solvente puro ou mistura adicionada às folhas foi de 90 mL. Os extratos foram deixados em repouso, sob ventilação forçada, até atingirem massa constante.

Para a análise cromatográfica, foram diluídos 2 mg de cada extrato em 2 mL de metanol (grau HPLC, marca J.T. Baker, Phillipsburg, USA). Em seguida, as amostras foram levadas ao banho ultrassônico por 10 minutos, permanecendo em repouso por pelo menos 1 hora. Após este período as amostras foram filtradas em membrana de

polifluoretano com porosidade 0,2 μm (PTFE, Chromafil). Os filtrados foram armazenados em *eppendorfs* de 2 mL a -4°C . Para as injeções cromatográficas foram pipetados 100 μL do filtrado (20°C) contendo extrato bruto e metanol, e diluídas em 400 μL na fase móvel utilizada.

Tabela 2 – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c).

Notação do extrato	Solventes			
	Etanol (e)	Acetato de etila (a)	Diclorometano (d)	Clorofórmio (c)
e	1	0	0	0
a	0	1	0	0
d	0	0	1	0
c	0	0	0	1
ea	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
ed	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	0
ec	$\frac{1}{2}$	0	0	$\frac{1}{2}$
ad	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
ac	0	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
dc	0	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
ead	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0
edc	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$
eac	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
adc	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
eadc(1)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
eadc (2)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
eadc (3)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as análises cromatográficas foi empregado um sistema Finnigan Surveyor 61607 juntamente com detector de arranjo de diodo Finnigan Surveyor PDA, injetor manual Rheodine e alça de injeção de 20 μL . Os analitos foram separados por uma coluna C_{18} Phenomenex® (250 x 4,6 mm d.i.) modelo Gemini com porosidade 5 μm e pré-coluna (4 x 3 mm d.i.). Os cromatogramas foram monitorados em 210; 254 e 280 nm numa vazão de 1,0 mL min^{-1} . Os dados foram processados usando *software* ChromQuest 4.2. Cada extrato preparado foi analisado em cada um das fases móveis, como descrito na sequência.

Escolha das Fases Móveis

Para a seleção da fase móvel o parâmetro de solventes de Snyder em fase reversa (FR) chamado de força-peso foi utilizado. Os efeitos da força de separação e polaridade da fase móvel foram investigados por um planejamento experimental de mistura consistindo de água, acetonitrila e metanol, tal como ilustrado na Fig. 3. As proporções de solventes foram calculadas considerando a força total de solvente (S_T), e os valores da polaridade (P').

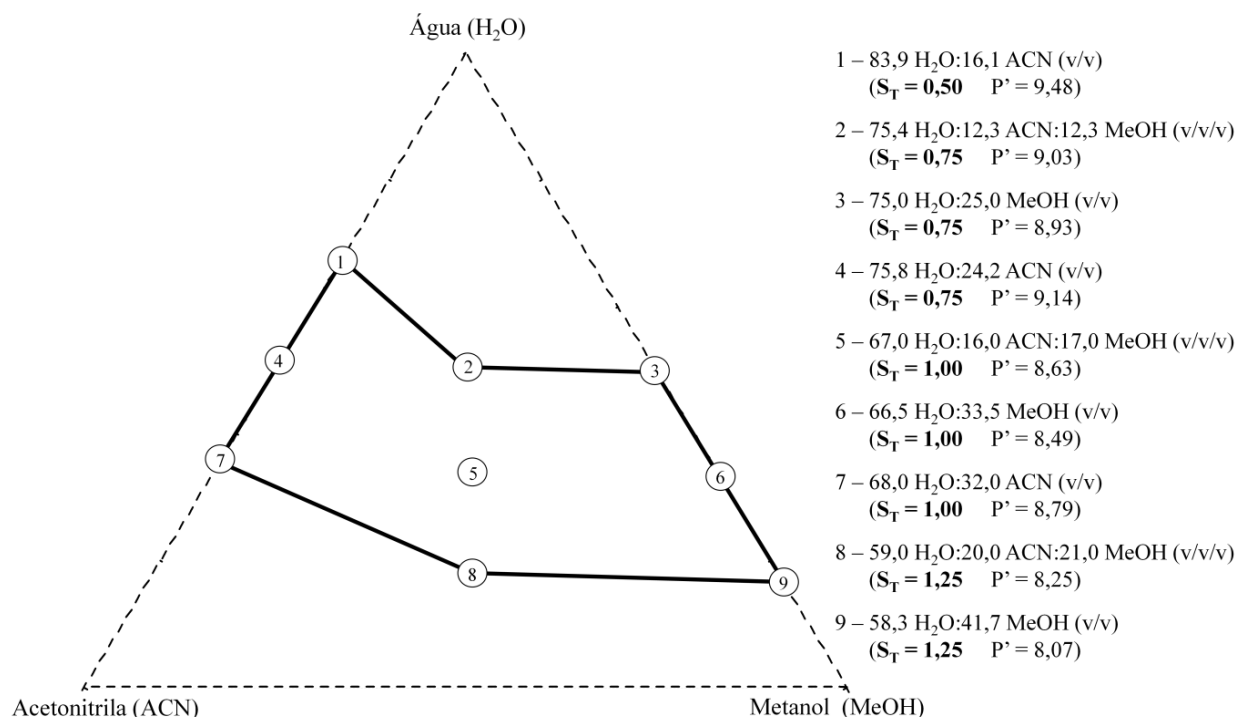


Figura 3 – Planejamento experimental para as fases móveis baseado nos parâmetros de seletividade de Snyder usado para a cromatografia de fase reversa, em que S_T e P' representam a força e polaridade do solvente, respectivamente.

Ensaio da Atividade Antioxidante

Para a análise dos extratos brutos pelo método da atividade captadora do radical DPPH[•], as soluções de cada extrato foram preparadas por dissolução de 7,5 mg de extrato em 25 ml de etanol. A partir dessa solução estoque, as soluções de trabalho foram preparadas com massas diferentes (1-40 µg mL⁻¹). A cada 3,0 mL da solução de trabalho de cada extrato bruto foram adicionados 0,1 mL de uma solução etanólica do radical livre de DPPH (1 mM). Após 30 min de incubação e protegidos da luz, os espectros das soluções resultantes foram registados num espectrofotometro Evolução 60S (Thermo Scientific) com a leitura da absorvância de 517 nm³². Os testes foram realizados em triplicadas. Como controle foi utilizado 0,1 mL de solução etanólica de DPPH 1mM e 3,0 mL de etanol.

Para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos brutos, calculou-se a porcentagem de inibição, conforme Eq. 3. A determinação da concentração necessária para causar 50% de inibição da concentração de DPPH (IC₅₀) foi realizada pela regressão linear das médias das triplicatas das concentrações em cada ponto.

$$IC_{50} = \frac{\text{Absorbância controle} - \text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância controle}} \quad \text{Eq. 3}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi avaliada a capacidade dos constituintes de cada extrato bruto, preparado por meio do planejamento de mistura do tipo centroide simplex, Tabela 2, das folhas da *C. sinensis* em capturar os radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH^{*}). Este tipo de análise foi importante para avaliar o efeito dos solventes quanto à extração dos compostos fenólicos.

Numa análise preliminar os extratos brutos apresentaram grandes variações da massa necessária para sequestrar 50% do radical livre de DPPH (IC₅₀). Portanto, tivemos que trabalhar com diferentes faixas de concentrações, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Equações das retas e seus respectivos valores de IC₅₀ dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, extraídas de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex.

Notação do extrato	Faixa dinâmica (µg mL ⁻¹)	Equação da reta	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
e	1 a 7	% Inibição ₁ = 4,1123 + 9,8009x	4,6820
		% Inibição ₂ = 1,9192 + 11,2719x	4,2655
a	1 a 15	% Inibição ₁ = -0,3578 + 5,0445x	9,9827
		% Inibição ₂ = 2,8107 + 4,9828x	9,4705
d	1 a 7	% Inibição ₁ = 3,7565 + 8,1176x	5,6967
		% Inibição ₂ = -2,5545 + 6,9589x	7,5521
c	10 a 40	% Inibição ₁ = 1,9624 + 1,2236x	39,2589
		% Inibição ₂ = -0,8913 + 1,0397x	48,9466
ea	1 a 7	% Inibição ₁ = 4,4862 + 9,7807x	4,6534
		% Inibição ₂ = -2,7006 + 11,9570x	4,4075
ed	1 a 7	% Inibição ₁ = -0,8658 + 7,6908x	6,6139
		% Inibição ₂ = -4,2258 + 8,5386x	6,3507
ec	1 a 7	% Inibição ₁ = 6,8830 + 6,8592x	6,2860
		% Inibição ₂ = -5,4457 + 8,2929x	6,6859
ad	10 a 40	% Inibição ₁ = 12,9996 + 1,5723x	23,5328
		% Inibição ₂ = 11,8530 + 1,5120x	25,2295
ac	5 a 20	% Inibição ₁ = 5,1512 + 2,7426x	16,3527
		% Inibição ₂ = 2,8618 + 2,8240x	16,6921
dc	10 a 40	% Inibição ₁ = 7,9985 + 0,8309x	50,5524
		% Inibição ₂ = 2,0841 + 0,9561x	50,1165
ead	1 a 7	% Inibição ₁ = 9,2963 + 9,9125x	4,1063
		% Inibição ₂ = 2,5528 + 10,6938x	4,4369
eac	1 a 7	% Inibição ₁ = -3,9273 + 8,9388x	6,0330
		% Inibição ₂ = -1,3359 + 9,2016x	5,5790
edc	1 a 7	% Inibição ₁ = -7,9522 + 9,6181x	6,0253
		% Inibição ₂ = -4,6048 + 8,6634x	6,3029
adc	5 a 20	% Inibição ₁ = -2,1645 + 1,8156x	28,7319
		% Inibição ₂ = -4,0109 + 1,9401x	27,8392
eadc (1)	1 a 7	% Inibição ₁ = 0,9241 + 7,0370x	6,9740
		% Inibição ₂ = 2,7153 + 7,8238x	6,0437
eadc (2)	1 a 7	% Inibição ₁ = 5,2981 + 6,9546x	6,4277
		% Inibição ₂ = 9,2430 + 7,6503x	5,3275
eadc (3)	1 a 7	% Inibição ₁ = 0,0885 + 7,4193x	6,7273
		% Inibição ₂ = -1,6340 + 8,6290x	5,9838

A Figura 4 mostra o efeito da composição do solvente sobre o IC_{50} dos extratos brutos da *C. sinensis* para as duas colheitas. Ao comparar os resultados, pode-se notar que o clorofórmio puro e a mistura binária de diclorometano:clorofórmio (50:50 v/v) apresentaram valores mais elevados de IC_{50} , seguido pela mistura ternária entre acetato de etila:diclorometano:clorofórmio e as misturas binárias de acetato de etila:diclorometano e acetato de etila:clorofórmio. Uma vez que um valor de IC_{50} mais baixo indica uma atividade antioxidante mais elevada, estes resultados indicam que os extratos preparados em clorofórmio e diclorometano:clorofórmio apresentaram as piores atividades antioxidantes. Misturas que não continham etanol também apresentaram maiores valores de IC_{50} , ou seja, capacidades antioxidantes inferiores. É interessante notar que as altas atividades antioxidantes também foram obtidas pelas misturas contendo etanol sendo etanol:acetato de etila e etanol:acetato de etila:diclorometano, as de maiores atividades.

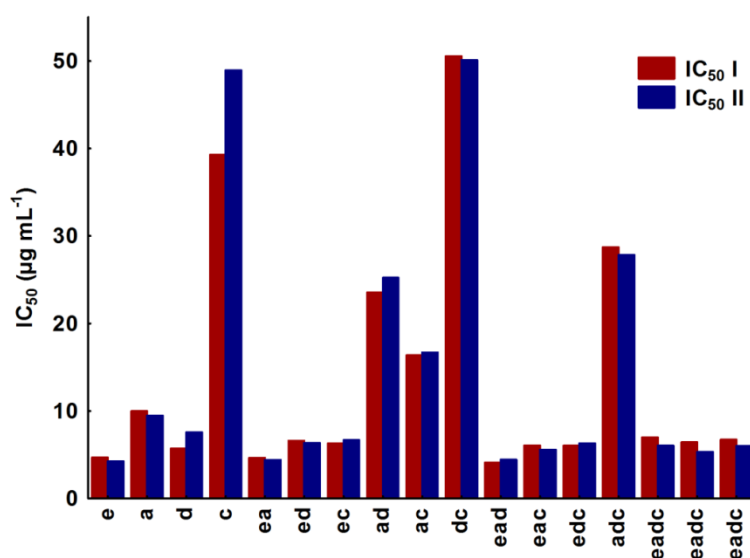


Figura 4 – Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira (I) e segunda (II) colheita extraídos de acordo com o planejamento experimental do tipo centróide simplex necessárias para sequestrar 50% do radical livre de DPPH^{*} (IC_{50}). Valor mais baixo indica maior atividade antioxidante.

Os resultados de um teste t-pareado não mostrou diferença significativa no nível

de confiança de 95% entre os valores de IC_{50} para as duas colheitas, ou seja, $t_{calculado}$ de 0,83 foi menor que $t_{tabelado}$ de 2,12. Portanto, os valores de IC_{50} foram analisados em conjunto para determinar a melhor composição do solvente extrator para aprimorar a atividade antioxidante. O modelo cúbico especial não mostrou falta significativa de ajuste no nível de confiança de 95%, como pode ser visto nos resultados da ANOVA na Tabela 4, e é dado pela Eq. 4, em que apenas os coeficientes significativos foram mostrados.

$$IC_{50} = 4,48e + 9,73a + 6,62d + 44,10c - 71,36ec + 64,67ad - 41,72ac + 99,73dc - 242,52ead - 423,13edc - 133,30adc$$

$(\pm 1,13)$ $(\pm 1,13)$ $(\pm 1,13)$ $(\pm 1,13)$ $(\pm 5,51)$ $(\pm 5,51)$ $(\pm 5,51)$ $(\pm 5,51)$ $(\pm 35,12)$ $(\pm 35,12)$ $(\pm 35,12)$

Eq. 4

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para ajuste do modelo dos resultados das concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* extraídos de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex necessárias para sequestrar 50% do radical livre de DPPH \cdot (IC_{50}).

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F _{calculado}
Regressão (R)	6612,210	13	508,631	198,430
Resíduos (r)	51,266	20	2,563	
Falta de ajuste (faj)	0,168	1	0,168	0,062
Erro puro (ep)	51,097	19	2,689	
Total (T)	6663,472	33	201,923	

O coeficiente linear de clorofórmio, conforme Eq. 4, apresentou um valor muito maior do que os demais solventes puros caracterizando uma menor capacidade antioxidante. Por outro lado, o coeficiente de etanol é menor, mas significativo no nível de confiança de 95%, o que indica a maior capacidade antioxidante. Efeitos sinérgicos e antagônicos significativos entre misturas binárias e ternárias podem ser observados a partir dos valores do coeficiente da equação do modelo 4. A interação etanol:diclorometano:clorofórmio (1:1:1 v/v/v) possui o efeito mais antagônico, devido ao alto coeficiente, seguido da mistura etanol:acetato de etila:diclorometano (1:1:1

v/v/v) e acetato de etila:diclorometano:clorofórmio (1:1:1 v/v/v).

A superfície de resposta para IC_{50} é mostrados na Figura 5 em função da proporção de solventes. O valor de IC_{50} mais baixo do gráfico de superfície de resposta é observada com uma mistura etanol:acetato de etila:diclorometano na proporção 55:25:20 (v/v/v).

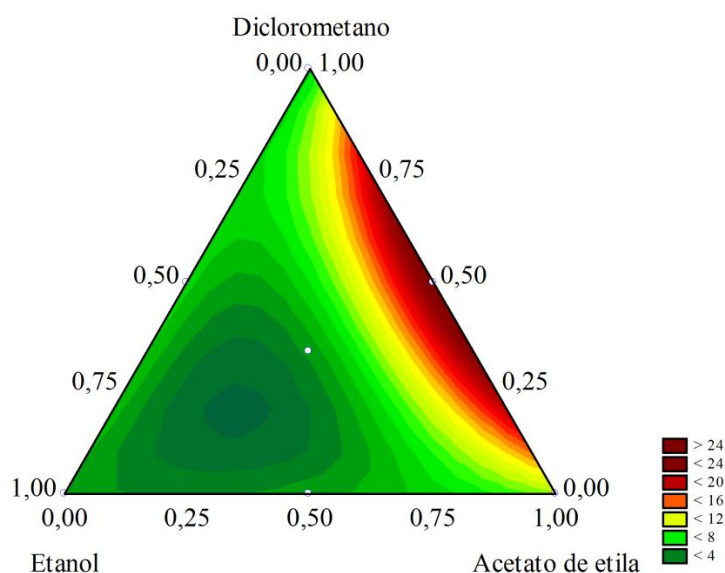


Figura 5 – Superfície de resposta para as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) necessárias para sequestrar 50% do radical livre de DPPH (IC_{50}) para ambas as colheitas de folhas de *C. sinensis* em função da composição dos solventes de etanol, acetato de etila e diclorometano.

Uma vez que as características estruturais dos compostos fenólicos são também responsáveis pela atividade antioxidante da extração, a separação e identificação das catequinas contidas nas folhas da *C. sinensis* foram avaliadas. A separação e identificação das catequinas foram realizadas por HPLC-DAD em fase reversa. O efeito do solvente de extração, bem como as fases móveis nas análises das catequinas foram investigados utilizando o planejamento de mistura da Tabela 2 em conjunto com o planejamento de mistura das fases da Figura 3, que representa não apenas as proporções relativas dos solventes modificados nas fases móveis, mas também a força total de solvente (S_T) e a polaridade (P'). A eficiência de extração de cada solvente foi

comparada através da abundância relativa de determinadas áreas dos picos cromatográficos.

Os resultados da Figura 6 mostram que a utilização do mesmo extrato bruto, porém modificando a composição da fase móvel provoca picos sobrepostos. Em outras palavras, a variação na força da fase móvel pode causar sobreposição de picos limitando a separação desejada dos metabólitos. A melhor resolução foi obtida usando a fase móvel preparada com 67:16:17 (v/v/v) de água:acetonitrila:metanol, pois só esta fase móvel separou os picos dos espectros da epicatequina (EC), epigallocatequina galato (EGCG) e epigallocatequina (EGC). Portanto, esta fase móvel foi utilizada para todas as análises subsequentes.

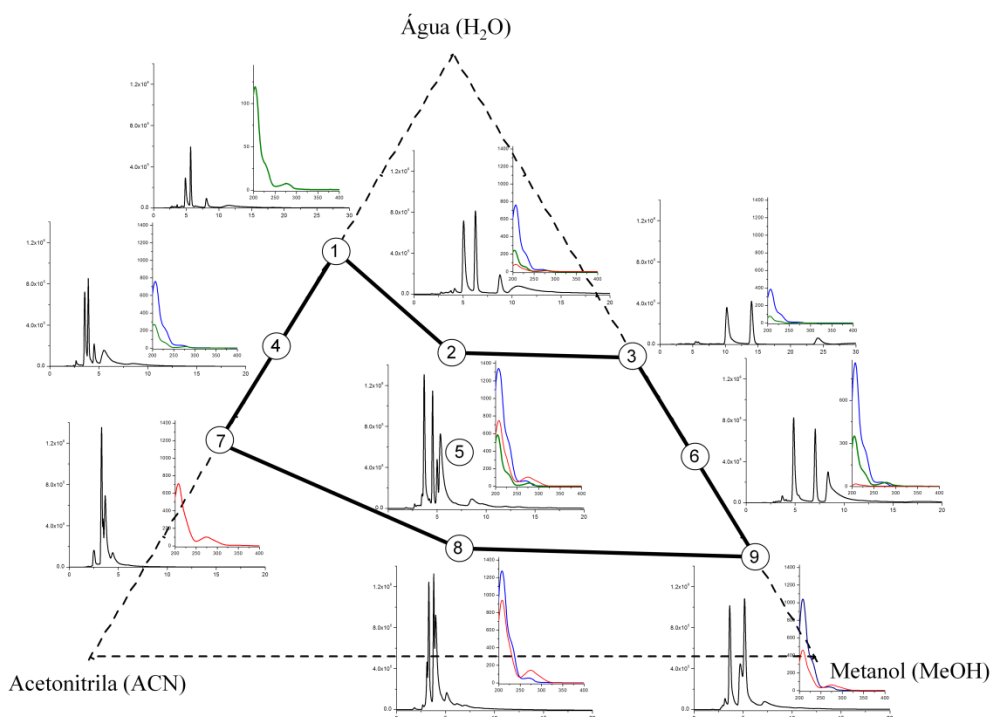


Figura 6 - Planejamento experimental para as fases móveis com seus respectivos cromatogramas e espectros das catequinas do extrato etanólico. Fase móvel: (1) 83,9:16,1 (v/v) de H₂O:ACN ($S_T = 0,50$ e $P' = 9,48$); (2) 75,4:12,3:12,3 (v/v/v) de H₂O:ACN:MeOH ($S_T = 0,75$ e $P' = 9,03$); (3) 75,0:25,0 (v/v) de H₂O:MeOH ($S_T = 0,75$ e $P' = 8,93$); (4) 75,8:24,2 (v/v) de H₂O:ACN ($S_T = 0,75$ e $P' = 9,14$); (5) 67,0:16,0:17,0 (v/v/v) de H₂O:ACN:MeOH ($S_T = 1,00$ e $P' = 8,63$); (6) 66,5:33,5 (v/v) de H₂O:MeOH ($S_T = 1,00$ e $P' = 8,49$); (7) 68,0:32,0 (v/v) de H₂O:ACN ($S_T = 1,00$ e $P' = 8,79$); (8) 59,0:20,0:21,0 (v/v/v) de H₂O:ACN:MeOH ($S_T = 1,25$ e $P' = 8,25$); (9) 58,3:41,7 (v/v) de H₂O:MeOH ($S_T = 1,25$ e $P' = 8,07$).

Para explorar o efeito do solvente de extração sobre a impressão digital das folhas da *C. sinensis* os dados cromatográficos foram submetidos a uma análise de componentes principais, organizados em uma matriz de 34 (amostras) x 616 (tempos de retenção) que corresponde a 15 diferentes proporções de solventes com uma triplicata no ponto central para cada colheita. As três primeiras componentes principais (CP) explicam 99,0% da variância total contida nos dados. A melhor discriminação dos grupos pode ser verificada na projeção da CP₂ e CP₃, que explicam 9,7 e 1,3% da variância total, respectivamente, Figura 7. Pode-se notar que os extratos sem etanol no solvente extrator possuem valores positivos na PC₂ enquanto os extratos etanólicos ou que continham etanol no solvente extrator têm valores negativos nesta componente. Além disso, os extratos brutos preparados em etanol, diclorometano e com a mistura binária etanol:acetato de etila também apresentam valor de escores mais positivos na CP₃.

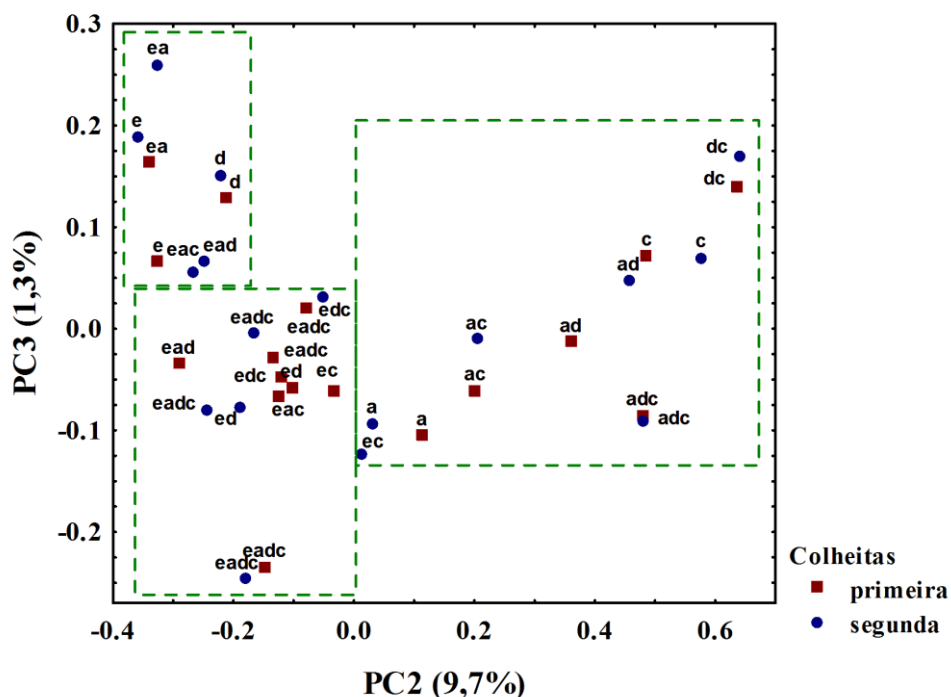


Figura 7 – Gráfico dos escores da CP₂ vs. CP₃ dos cromatogramas dos extratos obtidos a partir das misturas planejamento centroide simplex e analisados utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetona:metanol. e, a, d e c representam os solventes de etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, respectivamente.

Para ajudar a interpretar os diferentes grupos, foi utilizado o gráfico dos *loadings* da ACP apresentados na Figura 8. Podemos observar que as amostras na região mais positiva da CP₂ contêm abundâncias relativas mais elevadas de cafeína (tr = 4,53 min), enquanto que os da parte negativa têm maiores abundâncias relativas de EGC (tr = 3,66 min). Os extratos que se encontram com valores mais negativos na CP₂, mas mais positivos na CP₃ têm maiores abundâncias relativas de EGCG (tr = 5,28 min). No entanto, os extratos com valores de escores negativos nas PC₂ e PC₃ contêm maiores abundâncias relativas de EC (tr = 5,02 min). A partir desta figura, podemos verificar que a mistura binária entre etanol:acetato de etila extrai maiores quantidades de EGCG, seguido por diclorometano e etanol puro, enquanto EC e EGC podem ser extraídos com as outras misturas de solventes contendo etanol.

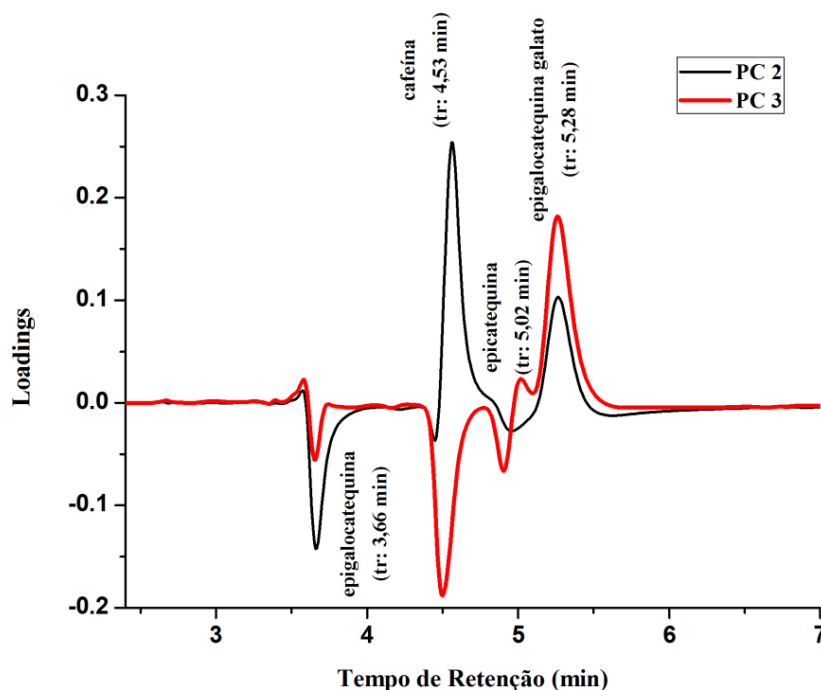


Figura 8 – Gráficos dos *loadings* das CP₂ e CP₃ dos cromatogramas dos extratos brutos preparados de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex e analisados utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol.

As abundâncias relativas das três catequinas de interesse (EC, EGCG e ECG) foram adquiridas por meio das áreas dos picos cromatográficos de cada extrato bruto de ambas as colheitas. Conforme a Figura 9, os resultados mostraram que as abundâncias relativas das catequinas nos extratos de segunda colheita são um pouco maior do que no de primeira e também existem diferenças nas abundâncias relativas das catequinas extraídas por etanol, diclorometano e misturas contendo etanol em relação aos outros solventes extratores. De um modo geral, a abundância relativa de EGCG é maior do que EGC que é maior do que EC. Os valores individuais da segunda colheita foram maiores do que os da primeira colheita e um teste-t utilizado para verificar se as diferenças entre as abundâncias relativas das duas colheitas são realmente significativa. Os resultados do teste t não mostraram diferença significativa ao nível de 95% das abundâncias relativas de dados da área do pico cromatográficos para os três catequinas destas duas safras. Portanto, todos os valores foram analisados em conjunto, como função da composição do solvente de extração para otimizar a extração das catequinas.

Com o intuito de aperfeiçoar a extração das catequinas, os modelos linear, quadrático e cúbico especial foram testados aos dados das áreas cromatográficas das três catequinas estudadas. A qualidade dos modelos foi determinada por meio da análise de variância dos resultados de regressão (ANOVA), num nível de confiança de 95%. Para a EC e EGC o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o cúbico especial, onde as equações 5 e 6 correspondem, respectivamente, a estas catequinas. Já para a EGCG o modelo que melhor se ajustou aos dados das áreas cromatográficas foi o quadrático, conforme Eq. 7, onde **e**; **a**; **d** e **c** representam respectivamente etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio. A estimativa do erro padrão está representada entre parênteses abaixo do correspondente coeficiente do modelo.

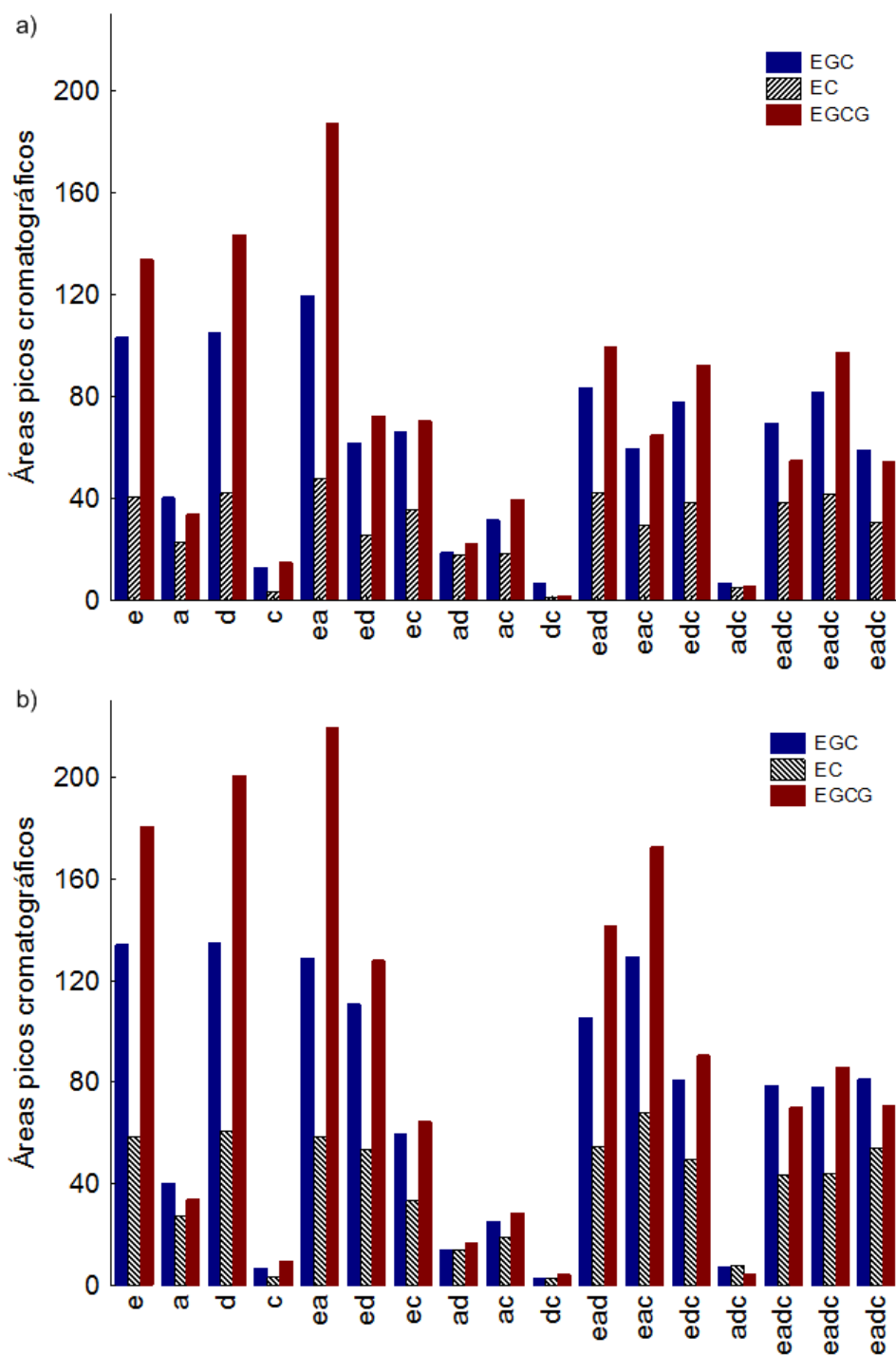


Figura 9 - Variação da área do pico cromatográfico de epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC) e epigallocatequina galato (EGCG) para a primeira (a) e segunda (b) colheita extraídas de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex e analisados utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol. e, a, d e c representam os solventes de etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, respectivamente.

$$\begin{aligned}
 EC = & 49,16e + 25,78a + 47,38d + 9,89c \\
 & (\pm 6,23) \quad (\pm 6,69) \quad (\pm 6,69) \quad (\pm 6,69) \\
 & + 98,40ea - 68,56ad - 107,63dc + 668,59edc \\
 & (\pm 31,08) \quad (\pm 31,08) \quad (\pm 32,91) \quad (\pm 195,25)
 \end{aligned}$$

Eq. 5

$$\begin{aligned}
 EGC = & 109,34e + 41,17a + 108,23d + 15,34c \\
 & (\pm 10,23) \quad (\pm 10,98) \quad (\pm 10,98) \quad (\pm 9,97) \\
 & + 240,21ea - 210,66ad - 223,59dc + 876,39edc \\
 & (\pm 51,03) \quad (\pm 51,04) \quad (\pm 54,05) \quad (\pm 320,66)
 \end{aligned}$$

Eq. 6

$$\begin{aligned}
 EGCG = & 152,61e + 37,61a + 167,76d + 12,94c \\
 & (\pm 16,29) \quad (\pm 16,29) \quad (\pm 17,76) \quad (\pm 14,78) \\
 & + 447,19ea - 320,17ad - 291,08dc \\
 & (\pm 75,74) \quad (\pm 75,70) \quad (\pm 75,74)
 \end{aligned}$$

Eq. 7

Como pode ser visto na Tabela 5, os valores de $F_{\text{calculado}}$ dos modelos acima não sofrem de falta de ajuste e são altamente significativos. Nas três equações supracitadas, os coeficientes lineares referentes ao etanol e diclorometano são aproximados ou maiores que as de acetato de etila, o qual é maior que o clorofórmio, no caso das três catequinas. Também nas três equações os coeficientes binários entre etanol:acetato de etila demonstram haver interação sinérgica entre estes solventes quanto à extração das catequinas de interesse e antagônica entre acetato de etila:diclorometano e diclorometano:clorofórmio. Nos modelos de EC e EGC há também um efeito sinérgico ternário entre etanol, diclorometano e clorofórmio, enquanto que para a EGCG existe um efeito antagônico binário entre etanol e diclorometano. Os coeficientes do modelo da EGCG também são maiores quando comparados com as outras duas catequinas, enquanto que para a EC são menores. Este tipo de comportamento já era esperado, pois na Figura 9, observamos que na maior parte das misturas de solventes para a extração da EGCG, as áreas dos picos cromatográficos são maiores que das de EGC e no caso da EC são os menores.

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para ajuste dos modelos de misturas obtidas a partir das áreas dos picos cromatográficos de EC, EGC e EGCG das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita extraídas de acordo com o planejamento experimental do tipo centroide simplex e analisadas utilizando a fase móvel na proporção 67:16:17 (v/v/v) água:acetonitrila:metanol.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)	F _{calculado}
EC				
Regressão (R)	9274,7	7	1325,0	12,064
Resíduos (r)	2855,4	26	109,8	
F. Ajuste (faj)	849,9	7	121,4	1,150
E. puro (ep)	2005,4	19	105,6	
Total (T)	12130,1	33	367,6	
EGC				
Regressão (R)	50414,3	7	7202,05	24,320
Resíduos (r)	7699,5	26	296,1	
F. Ajuste (faj)	2374,6	7	339,2	1,2104
E. puro (ep)	5325,0	19	280,3	
Total (T)	58113,9	33	1761,0	
EGCG				
Regressão (R)	111578,7	7	15939,8	24,448
Resíduos (r)	16951,8	26	652,0	
F. Ajuste (faj)	3905,2	7	557,9	0,812
E. puro (ep)	13046,6	19	686,7	
Total (T)	128530,5	33	3894,9	

Com base nessas observações, onde os modelos possuem tendências muito similares, podemos esperar que as respectivas superfícies de resposta para as áreas dos picos cromatográficos também sejam similares. Isso pode ser visualizado na Figura 10, onde as superfícies de EC, EGC e EGCG em funções de etanol, acetato de etila e diclorometano. Concordando com as equações 5 a 7, as maiores abundâncias relativas no caso das três catequinas é observada na parte de coloração verde mais intensa, ou seja, na proporção etanol:acetato de etila 70:30 (v/v)

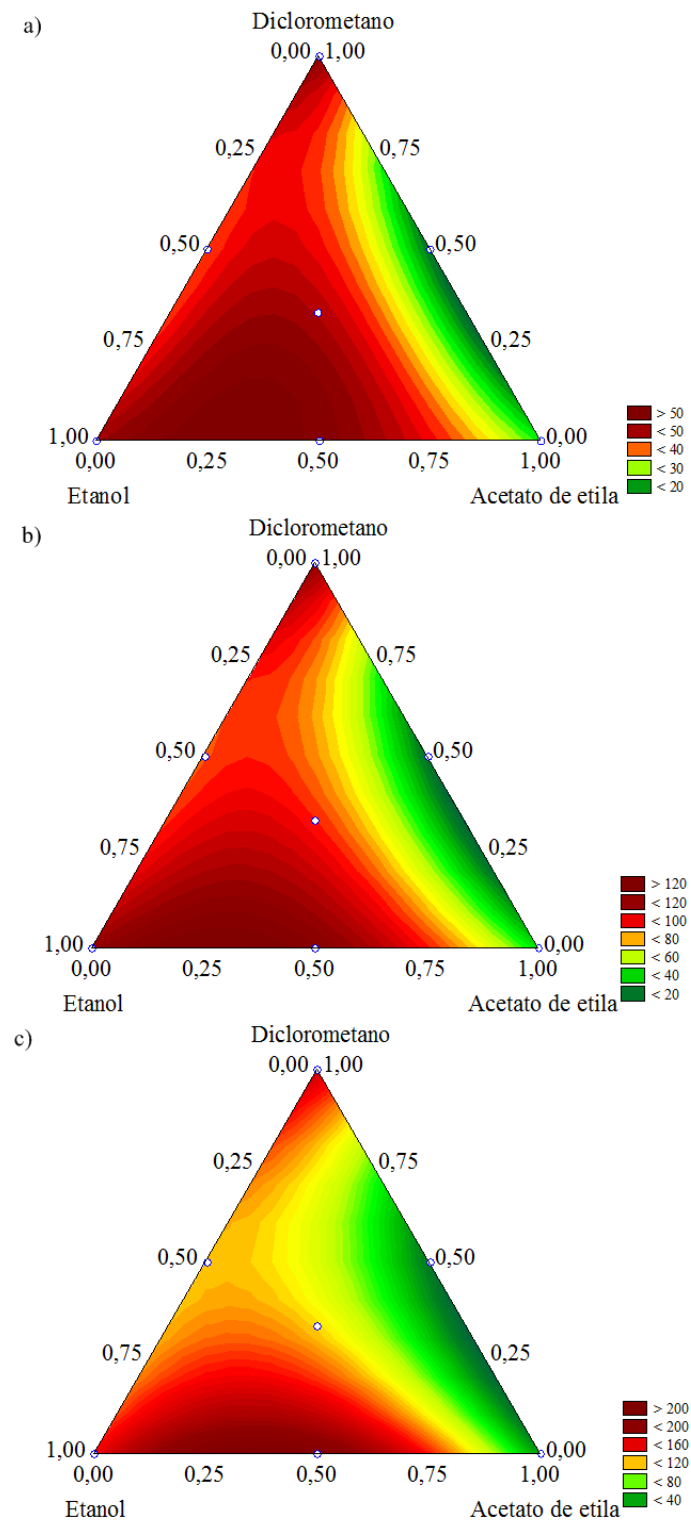


Figura 10 – Superfícies de resposta para as áreas dos picos cromatográficos da epicatequina (a), epigallocatequina (b) e epigallocatequina galato (c) para ambas as colheitas das folhas da *C. sinensis* em função da composição dos solventes de etanol, acetato de etila e diclorometano.

CONCLUSÕES

Estes resultados mostraram que a composição do solvente de extração afeta a eficiência da extração de catequinas. As abundâncias relativas na segunda colheita foram um pouco maior do que na primeira, mas as diferenças não foram significativas no nível de confiança de 95%. Abundância EGCG foi maior do que o EGC, que foi maior do que para a EC para todas as misturas de solventes de extração. Abundâncias relativas mais elevadas de EC, EGCG e EGC seriam obtidas pela mistura binária de etanol: acetato de etila na proporção 70:30 (v/v). Já para os valores de IC_{50} mais baixos ocorreriam com uma proporção de 55:25:20 (v/v/v) de etanol:acetato de etila: diclorometano.

REFERÊNCIAS

- ¹SONG, R.; KELMAN, D.; JOHNS, K.L.; WHIGHT, A.D. Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii. *Food Chemistry*, v. 133 p. 707-714, 2012.
- ²CHEN, T.O. All teas are not created equal: The chinese green tea and cardiovascular health. *International Journal of Cardiology*, v. 108, p. 301-308, 2006.
- ³CHUNG, F.L.; SCHWARTZ, J.; HERZOG, C.R.; YANG, Y.M. Tea and cancer prevention: Studies in animals and humans. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 3268–3274, 2003.
- ⁴FUJIKI, H.; SUGANUMA, M.; IMAI, K.; NAKACHI, K. Green tea: Cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Letter*, v. 188, p. 9–13, 2002.
- ⁵JIAN, L.; XIE, L.P.; LEE, A.H.; BINNS, C.W. Protective effect of green tea against prostate cancer: A case-control study in south east China. *International Journal of Cancer*, v. 108, p. 130–135, 2004.
- ⁶LEUNG, L.K.; SU, Y.; CHEN, R.; ZHANG, Z.; HUANG, Y.; CHUNG, Z.Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 2248-2251, 2001.
- ⁷YANG, Y.C.; LU, F.H.; WU, J.S.; WU, C.H.; CHANG, C. J. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Archives of Internal Medicine*, v. 164, p. 1534–1540, 2004.
- ⁸KANDA, H.; LI, P.; MAKINO, H. Production of decaffeinated green tea leaves using liquefied dimethyl ether. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 376–380, 2013.
- ⁹SUZUKI, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M. Health-promoting effects of green tea. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, v. 88, p. 88–101, 2012.
- ¹⁰VAYALIL, P.K.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*. v. 24, p. 927-936, 2003.
- ¹¹LEE, B.L.; ONG, C.N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 439–447, 2000.

¹²TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid-peroxidation in phospholipid-bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 308, p. 278–284, 1994.

¹³PERCIVAL, M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, v. 31, p. 1-4, 1998.

POOLE, C. F. & DIAS, N. C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 892, p. 123-142, 2000.

¹⁴BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, v. 219, p. 561-571, 2004.

¹⁵KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Science*, v. 81, p. 519-533, 2007.

¹⁶BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

¹⁷RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico 127 online*. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, p.1-4, 2007. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_127.pdf. Acesso: 02 de janeiro de 2015.

¹⁸SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, p. 270-276, 1998.

¹⁹NALDI, M.; FIORI, J.; GOTTI, R.; PÉRIAT, A.; VEUTHEY, J.L.; GUILLARME, D.; ANDRISANO, V. UHPLC determination of catechins for the quality control of green tea. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 88, p. 307-314, 2014;

²⁰CHEN, Q.; ZHAO, J.; CHAITAP, S.; GUO, Z. Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy, *Food Chemistry*, v. 113, p. 1272–1277, 2009.

²¹KOTANI, A.; TAKAHASHI, K.; HAKAMATA, H.; KAJIMA, S.; KUSU, F. Attomole catechins determination by capillary liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical sciences*, v. 23, p. 157–163, 2007.

- ²²VOVK, I.; SIMONOVSKA, B.; VUORELA, H. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography A*, v. 1077, p. 188–194, 2005.
- ²³BALDERMANN, S.; FLEISCHMANN, P.; WATANABE, M.B.N.; WINTERHALTER, P.; ITO, Y. Centrifugal precipitation chromatography, a powerful technique for the isolation of active enzymes from tea leaves (*Camellia sinensis*). *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 4263–4267, 2009.
- ²⁴KUMAR, N.S.; RAJAPAKSHA, M. Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1083, p. 223–228, 2005.
- ²⁵YANAGIDA, A.; SHOJI, A.; SHIBUSAWA, Y.; SHINDO, H.; TAGASHIRA, M.; IKEDA, M.; ITO, Y. Analytical separation of tea catechins and food-related polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, p. 195–201, 2006.
- ²⁶SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development, 2nd ed., New York:Wiley, 1997.
- ²⁷COLLINS, C.H.; BRAGA, C.G.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas:Editora da Unicamp, 2006. 456 p.
- ²⁸SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. Introduction to modern liquid chromatography, 2nd ed., New York:Wiley, 1979.
- ²⁹POOLE, C.F.; DIAS, V.C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 892, p. 123–142, 2000.
- ³⁰SNYDER, L.R.; CARR, P.W.; RUTAN, S.C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *Journal of Chromatography A*, v. 656, p. 537–547, 1993.
- ³¹COENEGRACHT, P.M. J.; METTING, H.J.; SMILDE, A.K.; COENEGRACHT-LAMERS. A chemometric investigation of the selectivity of multisolvent mobile phase systems in RP-HPLC. *Chromatographia*, v. 27, n. 2-3, feb., 1989.
- ³²ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, p. 231–235, 2007.



CAPÍTULO V



ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DA *Camellia sinensis* L. USANDO CLAE-DAD-IES/EM E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

INTRODUÇÃO

As folhas de chá verde são constituídas por três grupos de componentes que têm efeitos sobre a saúde humana: bases xantinas, óleos essenciais e compostos fenólicos¹. As folhas da *C. sinensis* possuem antioxidantes polifenólicos que são representados, principalmente, pelas catequinas: (-)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina (EGC), (+)-catequina (C), (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG), (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequina galato (GCG) e (-)-epicatequinagalato (ECG). Elas são conhecidas por terem efeitos antibacterianos e antivirais, prevenir doenças cardiovasculares, reduzir o risco de câncer, propriedades antialérgicas, entre outros¹⁻³. Além das catequinas, existem muitos outros componentes químicos do chá verde com efeitos benéficos, como a cafeína, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e miricetina, entre outros¹⁻².

Os extratos das folhas da *C. sinensis* contém uma mistura constituída de um grande número de compostos químicos, assim a utilização de ferramentas analíticas adequadas que permitam identificá-los é de primordial importância. A extração de compostos em diferentes sistemas de solventes tem sido proposta, no entanto, há uma falta de estudos na literatura comparando diferentes solventes para extração. Embora os métodos cromatográficos permitam uma boa resolução dos picos, em geral, o grande número de compostos coeluídos dificulta a recuperação de informações confiáveis desse tipo de amostra.

A fim de resolver os problemas de coeluição, ferramentas quimiometria podem complementar a análise cromatográfica. A aplicação do modelo-flexível de Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS) tem demonstrado ser um excelente método para a resolução e quantificação de amostras de misturas complexas analisadas por métodos cromatográficos⁴⁻⁶. O MCR-ALS⁷ tem sido usado para a resolução de respostas com múltiplos componentes em misturas não resolvidas, onde os perfis dos espectros puros e de eluição dos diferentes componentes (analitos de interesse e os compostos que interferem na coeluição) são obtidos e a sua quantificação relativa pode ser determinada.

Nesta etapa do trabalho, os efeitos de diferentes solventes foram investigados sobre a extração de metabólitos da *C. sinensis*, utilizando um planejamento do tipo centroide simplex. Além disso, os metabólitos extraídos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodo e espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-DAD-IES/EM) e ferramentas quimiométricas, tais como MCR-ALS e OSC-PLS-DA. Os dados obtidos por detecção DAD e EM, a partir das diferentes corridas cromatográficas dão informações complementares sobre a resolução dos constituintes da amostra. Assim, uma estratégia adequada foi proposta para resolver as sobreposições dos picos dos diferentes metabólitos a partir da análise simultânea dos dados de DAD e EM por MCR-ALS. Essa estratégia permite uma melhor identificação e quantificação dos componentes resolvidos. A análise por PLS-DA foi aplicada às áreas dos picos permitindo a investigação das possíveis diferenças entre as amostras da *C. sinensis* investigadas, em especial entre as diferentes colheitas, e os metabólitos responsáveis por tal discriminação.

METODOLOGIA

Material Vegetal

Quatro conjuntos de amostras de folhas da *C. sinensis* foram gentilmente cedidos pela fazenda Agrochá Boa Vista (Araucária, PR, Brasil). O primeiro conjunto de amostras foi coletado em setembro de 2011 e correspondente a primeira colheita após a poda dos arbustos. Dezoito dias depois, o segundo conjunto de amostras foi coletado, quando novas folhas estavam prontas para serem colhidas. Nesses mesmos períodos, as amostras das folhas de *C. sinensis* foram colhidas em 2012.

Preparo dos Extratos e Padrões de Referência

Cada extrato foi preparado com 1,0 g da amostra da *C. sinensis*, previamente triturado e peneirado, com adição de 6,0 mL das misturas de solventes listados na Tabela 1. Em seguida, cada mistura foi colocada no banho de ultrassom durante 30 minutos e filtrada para separar a solução a partir das folhas. Esse procedimento foi repetido mais catorze vezes, até que o volume total de solvente adicionado, puro ou na forma de mistura, alcançou 90 mL. Os extratos brutos foram então concentrados ao ar e em seguida a liofilização foi realizada em liofilizador Virtis SP Scientific, a $-81,5 \pm 0,1$ °C e 20 ± 2 mTorr, até obtenção de massa constante.

Para a análise por CLAE 2,0 mg de extrato foram solubilizados em 2,0 mL de uma solução constituída por MeOH/H₂O (30:70 v/v) adquiridos da LiChrosolv grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha). A filtração foi efetuada por meio de membrana de polipropileno hidrofílica (GHP) com 13 mm de diâmetro e porosidade de 0,2 µm da Chromafil (PALL, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Os padrões de referência utilizados foram: (-) - epigallocatequina galato ($\geq 80\%$ HPLC), a partir de chá verde, (-)-

epicatequina ($\geq 90\%$ HPLC) da Sigma Chemical e cafeína da Fluka.

Tabela 1 – Planejamento de misturas do tipo centroide simplex para a escolha do solvente extrator envolvendo etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d) e clorofórmio (c).

Notação do extrato	Solventes			
	Etanol (e)	Acetato de etila (a)	Diclorometano (d)	Clorofórmio (c)
e	1	0	0	0
a	0	1	0	0
d	0	0	1	0
c	0	0	0	1
ea	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
ed	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	0
ec	$\frac{1}{2}$	0	0	$\frac{1}{2}$
ad	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
ac	0	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
dc	0	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
ead	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0
edc	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$
eac	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
adc	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
eadc(1)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
eadc (2)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
eadc (3)	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$

Condições Cromatográficas (CLAE-DAD-IES/EM)

Para análise por CLAE-DAD-IES/EM, um sistema Waters 2690 LC foi acoplado em série a um detector de arranjo de diodo Waters 996 (DAD) e um espectrômetro de massas (EM) Quattro Micro (Waters, Milford, MA, USA). O volume de injeção foi de 5 μL para cada extrato bruto. Os analitos foram separados por uma coluna de fase reversa

Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ da Agilent (150 mm x 2,1 mm) com partículas de 5 µm e vazão de 0,2 mL min⁻¹. A fase móvel foi constituída pela combinação de A (0,1% ácido fórmico em água) e B (acetonitrila). O gradiente de eluição foi o seguinte: t = 0 min, 10% de B; t = 7 min, 15% de B; t = 26 min, 20% de B; t = 29 min, 25% de B; t = 30 min, 25% de B; t = 31 min, 10% de B; t = 35 min, 10% de B. O monitoramento no detector DAD foi na faixa de absorvância de 190 a 800 nm. Os espectros de massas foram adquiridos simultaneamente em razão massa/carga (*m/z*) 50-1000. Para a ionização por *electrospray* (IES) em modo negativo, a voltagem do capilar utilizada foi de -2.8 kV e do cone de -38 V e em modo positivo a voltagem do capilar foi de 3.0 kV e do cone de 32 V. As temperaturas da fonte e dessolvatação foram de 120 e 350°C, respectivamente e o fluxo de gás do cone e de dessolvatação de 43 e 644 L h⁻¹.

Conversão dos Dados

O *software* Masslynx versão 3.5 (Waters, Mass., EUA) foi utilizado para o controle e aquisição de dados no sistema de CLAE-DAD-IES/EM. Esses dados gerados foram convertidos a partir dos arquivos .raw para .ascii (.txt) usando DataBridge (Waters, Mass., EUA). Em seguida, foram importados para o *software* Matlab^{®8} para pré-tratamentos, análise e visualização dos resultados.

ANÁLISE DOS DADOS

Preparação dos Dados

Cada corrida cromatográfica de cada extrato bruto, Tabela 1, forneceu três matrizes de dados, uma da detecção DAD, e outras duas da detecção por EM, uma no modo negativo de ionização e outra no modo positivo. Esses detectores fornecem

frequências de aquisição espectrais diferentes num mesmo intervalo de tempo. Assim, a matriz DAD obtida nos forneceu dimensões de 1793 (tempos de retenção) x 611 (comprimentos de onda) e as matrizes EMp e EMn matrizes de dimensões contendo 488 (tempos de retenção) x 951 (m/z) e 487 (tempos de retenção) x 951 (m/z), respectivamente. Para analisar simultaneamente essas matrizes de DAD e EM, elas devem ser sincronizadas com o mesmo vetor tempo antes da fusão em uma única matriz aumentada. Portanto, o deslocamento adequado e interpolação de dados de DAD para os de EM com o mesmo eixo de tempo é necessário⁹. A sincronização foi realizada utilizando interpolação linear de acordo com o vetor de tempo de retenção variando entre 2,60 a 27,96 min com intervalo de 0,062 minutos. Assim, novas matrizes espectrais com os mesmos tempos de retenção foram finalmente obtidas, ou seja, a matriz DAD com dimensões de 410 x 611; e EMn e EMp com dimensões de 410 x 951, sem perda de qualquer informação relevante por esta operação. O restante dos tempos de retenção foi eliminado por não conter qualquer informação adicional.

Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP é um método estatístico multivariado ao qual calcula novos eixos ortogonais, chamados componentes principais a partir das combinações lineares das variáveis originais dos dados, no sentido de explicar variação máxima de dados¹⁰. Portanto, em primeiro lugar a ACP foi usada na exploração inicial do efeito dos solventes sobre a folha de *C. sinensis* no procedimento de extração a partir dos dados obtidos por CLAE-DAD. As dimensões da matriz de dados obtida para cada corrida cromatográfica de cada extrato bruto continha 1793 linhas (tempos de retenção, variando de 0 a 35 min) e 611 colunas (comprimentos de onda de 190 a 800 nm). Essa

matriz teve seus tamanhos reduzidos, dando um subconjunto de 410 tempos de retenção (2,60-27,96 minutos) e 201 comprimentos de onda (200 a 400 nm).

A partir dessas novas matrizes, os Cromatogramas de Absorbâncias Totais (do inglês, *Total Absorbance Chromatogram* – TAC) foram calculados pela soma de todos os valores de absorção em cada tempo de retenção e a linha de base e o *background* foram corrigidos pelo algoritmo dos mínimos quadrados assimétrico proposto originalmente por Eilers (2004)¹¹. O método utilizando o algoritmo de COW (do inglês, *Correlation Optimized Warping*)¹²⁻¹³ foi utilizado para alinhar os picos cromatográficos deslocados. Esse algoritmo exige dois parâmetros de entrada do usuário: o comprimento do segmento e a flexibilidade também chamada de tamanho de folga, aos quais foram selecionados de acordo com o método proposto por Skov et al. (2006)¹⁴. Após esse tratamento os TACs dos 68 extratos foram dispostos em uma única matriz de dados TACs (68 linhas e 410 colunas), onde foram centradas na média antes da aplicação da ACP.

Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS)

O modelo bilinear assumido pela MCR, Eq. 1, para a análise do conjunto de dados obtidos em uma corrida cromatográfica, corresponde a um único extrato da *C. sinensis*:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 1}$$

onde, as linhas da matriz \mathbf{D} são os espectros DAD e/ou EM registados em diferentes tempos de eluição e as colunas da matriz \mathbf{D} são os perfis de eluição de cromatografia registados em diferentes comprimentos de onda e/ou valores de m/z . \mathbf{C} é a matriz dos

perfis de eluição dos compostos resolvidos na análise da corrida cromatográfica no teste dos extratos brutos. \mathbf{S}^T é a matriz dos espectros puros resolvidos. \mathbf{E} é a matriz residual com valores de elemento não explicados pelas espécies químicas nas matrizes \mathbf{C} e \mathbf{S}^T 6,15.

Ao juntar todos os cromatogramas dos extratos obtém-se uma matriz muito grande e complexa. Para facilitar a análise desses cromatogramas simultaneamente, cada cromatograma (DAD e/ou EM) foi dividido em seis janelas de eluição. Isso foi realizado de modo a garantir que todas as janelas possuíssem o mesmo tamanho (para $\mathbf{D}_{k(\text{DAD ou EMn ou EMP})}$). A Figura 1a mostra um exemplo dos limites dos tempos selecionados para cada janela cromatográfica na análise do extrato bruto extraído com etanol puro, fornecendo as matrizes $\mathbf{D}_{k,\text{DAD}}$, $k=a,b,c,d,e,f$. Esses limites foram estipulados para os demais extratos brutos do planejamento experimental (Tabela 1). As janelas, com os mesmos tempos, dos diferentes extratos brutos foram então dispostas de acordo com a Figura 1b, onde $\mathbf{D}_{\text{kaum}(\text{DAD})N}$ refere-se à matriz de dados na forma de colunas aumentadas na análise simultânea da janela cromatográfica k de N diferentes extratos brutos.

Os mesmos limites da janela de tempos foram aplicados ao conjunto de dados obtidos por CLAE-IES/EM em modo positivo e negativo. As janelas com os mesmos tempos de retenção foram organizadas por colunas aumentadas, fornecendo as matrizes $\mathbf{D}_{\text{kaum}(\text{EMP})N}$ e $\mathbf{D}_{\text{kaum}(\text{EMn})N}$. O modelo bilinear usado para analisar a matriz DAD, $\mathbf{D}_{\text{kaum}(\text{DAD})N}$, é dada na Eq. 2. Esse mesmo modelo foi também utilizado nas matrizes $\mathbf{D}_{\text{kaum}(\text{EMP})N}$, e $\mathbf{D}_{\text{kaum}(\text{EMn})N}$.

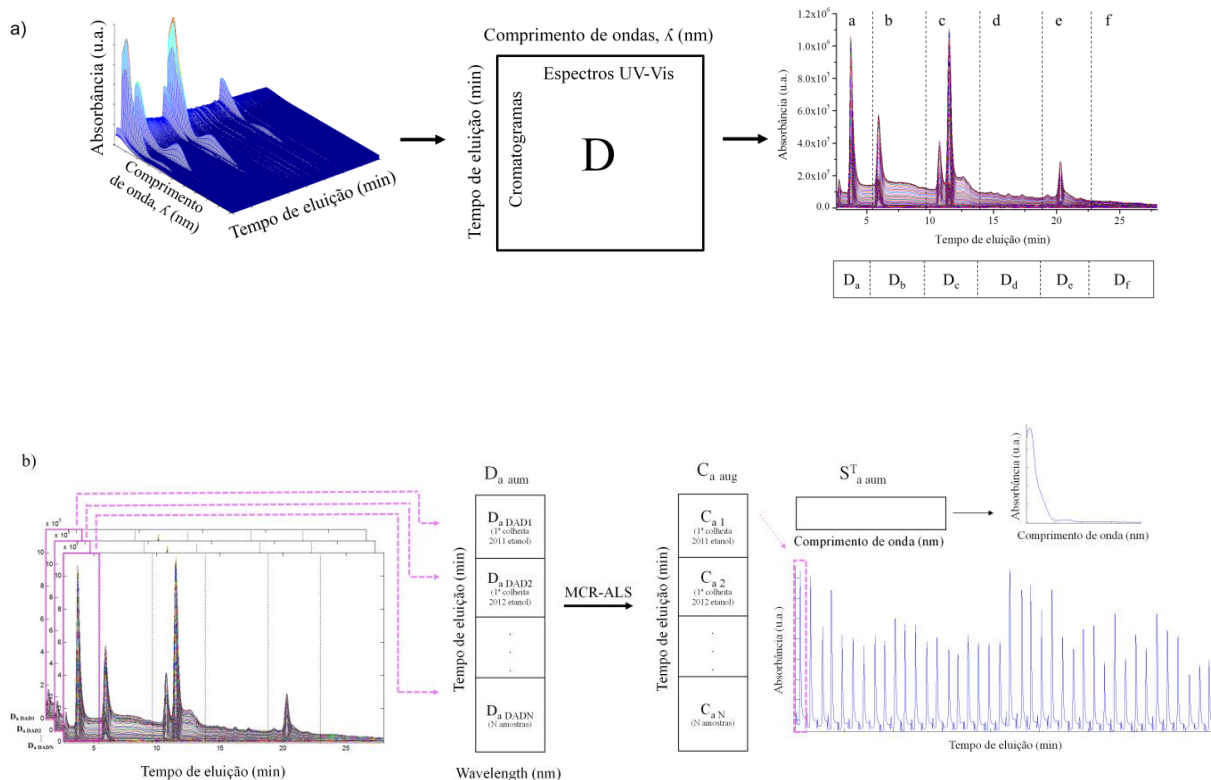


Figura 1 - (a) Esquema da separação das seis janelas de eluição dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, utilizando como exemplo o extrato bruto das folhas da *C. sinensis* extraído com etanol puro para análise por MCR-ALS. As linhas tracejadas delimitam os limites dos intervalos dos tempos de eluição. (b) MCR modelo bilinear com colunas aumentadas referentes aos dados cromatográficos e espectrais dos extratos brutos obtidos por CLAE-DAD, $\mathbf{D}_{kaum(DAD)N}$.

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}_{kaum(DAD)N} &= [\mathbf{D}_{k(DAD)1}, \mathbf{D}_{k(DAD)2}, \dots, \mathbf{D}_{k(DAD)N}] \\
 &= [\mathbf{C}_{k(DAD)1}, \mathbf{C}_{k(DAD)2}, \dots, \mathbf{C}_{k(DAD)N}] \mathbf{S}^T \\
 &\quad + [\mathbf{E}_{k(DAD)1}, \mathbf{E}_{k(DAD)2}, \dots, \mathbf{E}_{k(DAD)N}] \\
 &= [\mathbf{C}_{kaum(DAD)N} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{kaum(DAD)N}]
 \end{aligned} \tag{Eq. 2}$$

As três possíveis matrizes de dados aumentadas (CLAE-DAD, CLAE-IES/EMP and CLAE-IES/EMn) de cada janela de tempo foram novamente fundidas em uma nova matriz supraumentada por linhas e colunas $\mathbf{D}_{k(DAD-EMPn)}$ ou $\mathbf{DAD-EMnN}$, que de acordo com modelos bilineares MCR podem ser modeladas como:

$$\mathbf{D}_{\text{kaum(DAD-EM}_p\text{)N}} = \mathbf{C}_{\text{kaum(DAD-EM}_p\text{)N}} \mathbf{S}_{\text{kaum(DAD-EM}_p\text{)}}^T + \mathbf{E}_{\text{kaum(DAD-EM}_p\text{)N}} \quad \text{Eq. 3}$$

$$\mathbf{D}_{\text{kaum(DAD-EM}_n\text{)N}} = \mathbf{C}_{\text{kaum(DAD-EM}_n\text{)N}} \mathbf{S}_{\text{kaum(DAD-EM}_n\text{)}}^T + \mathbf{E}_{\text{kaum(DAD-EM}_n\text{)N}} \quad \text{Eq. 4}$$

Como mostrado na Eq. 3, a decomposição da matriz aumentada por linhas e colunas $\mathbf{D}_{\text{aum(DAD-EM}_p\text{)}}$ fornece a matriz $\mathbf{C}_{\text{kaum(DAD-EM}_p\text{)}}$ contendo os perfis de eluição puros, ou seja, as concentrações dos metabólitos em cada corrida cromatográfica de acordo com a janela dos tempos específicos analisada. Já a matriz $\mathbf{S}_{\text{(DAD-EM}_p\text{)}}^T$ fornece os correspondentes espectros puros DAD e EM_p (ionização positiva), que são comuns para todas as corridas cromatográficas analisadas simultaneamente. $\mathbf{E}_{\text{aum(DAD-EM}_p\text{)N}}$ contém o erro experimental não explicado pelo modelo bilinear^{4,6}. O mesmo ocorre com a Eq. 4 com a matriz fundida $\mathbf{D}_{\text{aum(DAD-EM}_n\text{)N}}$.

O número de componentes presentes numa dada janela cromatográfica, analisada por MCR-ALS, foi inicialmente estimado pela análise da decomposição de valores singulares (SVD, do inglês *Singular Value Decomposition*), onde os componentes significativos (a partir dos constituintes químicos dos extratos brutos analisados) devem dar origem a valores singulares maiores do que aqueles relacionados ao ruído¹⁶. As estimativas iniciais dos espectros puros desses constituintes, matriz \mathbf{S}^T , foram obtidas por técnicas baseadas na detecção de variáveis "purest"¹⁷ a partir dos dados cromatográficos para a janela de tempo considerada. Durante a otimização ALS^{7,9} as restrições aplicadas foram de não-negatividade, unimodalidade (somente se necessário) e normalização dos espectros (mesma área Euclidiana). Para avaliar a qualidade do ajuste dos dados, após aplicação do método de MCR-ALS, a porcentagem de falta de ajuste (LOF, do inglês *Lock Of Fit*) e a porcentagem de variância explicada (R^2) foram calculadas de acordo com as Eq. 5 e 6, respectivamente.

$$lack\ of\ fit\ (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - d_{ij}^*)^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad \text{Eq. 5}$$

em que, d_{ij} são elementos dos dados brutos conjunto **D** e d_{ij}^* são os mesmos elementos obtidos com o modelo de MCR-ALS.

Além disso,

$$R^2 = 100 \times \left(1 - \frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \right) \quad \text{Eq. 6}$$

em que, e_{ij} são os elementos da matriz **E** e d_{ij} são elementos dos dados brutos conjunto

D.

Todos os programas de MCR-ALS estão em MATLAB⁸ e estão disponíveis gratuitamente a partir da página inicial do MCR no <http://www.mcrals.info/>.

Correção do Sinal Ortogonal na Análise Discriminante com Métodos de Mínimos Quadrados Parciais (OSC-PLS-DA)

O método por PLS-DA¹⁸ consiste de uma regressão PLS empregando um conjunto de variáveis de previsão **X** e uma resposta categórica **Y** de variáveis binárias que expressam membros da classe¹⁹. Esse método procura um melhor conjunto de variáveis latentes capazes de discriminar entre as categorias definidas com as melhores combinações lineares dos valores originais independentes de **X**, que se correlacionam otimamente com os membros da classe proposta na variável dependente, **Y**²⁰⁻²¹. A correção do sinal ortogonal (OSC)²² é um método de pré-processamento desenvolvido para remover variação sistemática na matriz de dados **X**, que não está correlacionado à

matriz de resposta \mathbf{Y} , e, conseqüentemente, melhorar e tornar mais simples modelos PLS²³, como já mencionado anteriormente.

OSC-PLS-DA foi aplicada à matriz de dados com dimensões de 20 extratos brutos x 8 metabólitos. Essa matriz contém as áreas de pico de 8 metabólitos em comum resolvidos anteriormente por MCR-ALS a partir da análise simultânea dos conjuntos de dados de CLAE-DAD de todos os extratos brutos que foram extraídos por etanol ou mistura de solvente contendo etanol. Esses metabólitos com as respectivas áreas dos picos foram selecionados para todas as amostras analisadas a partir da primeira e segunda colheita, separadamente para cada ano (2011 e 2012). As áreas foram auto-escaladas antes da análise por PLS-DA.

Para a seleção das variáveis mais relevantes, que realmente possuem um efeito sobre a separação, foram calculados os escores VIPs (do inglês, *Variable Importance in Projection*)^{19,24}. Os valores dos VIPs representam a contribuição de cada preditor em ajustar o modelo para preditores e resposta, ou seja, sumariza a contribuição que uma variável tem sobre o modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do solvente extrator sobre as folhas da *C. sinensis*, utilizando o planejamento experimental, Tabela 1, foi analisado por meio dos TACs obtidos por CLAE-DAD aplicando a ACP. Esses dados foram organizados numa matriz com 68 extratos x 410 comprimentos de onda, correspondentes a 15 proporções de diferentes solventes, com triplicata no ponto central para as duas colheitas nos dois anos analisados (2011 e 2012). O gráfico dos escores das duas primeiras componentes principais, que correspondem por 86,17% da variância total, pode ser observada através da Figura 2. A CP₁ diferencia os extratos brutos extraídos com e sem etanol na

composição do solvente extrator. Os extratos preparados contendo etanol estão localizados no lado positivo da CP_1 e extratos preparados sem etanol estão no lado negativo direito desta componente principal.

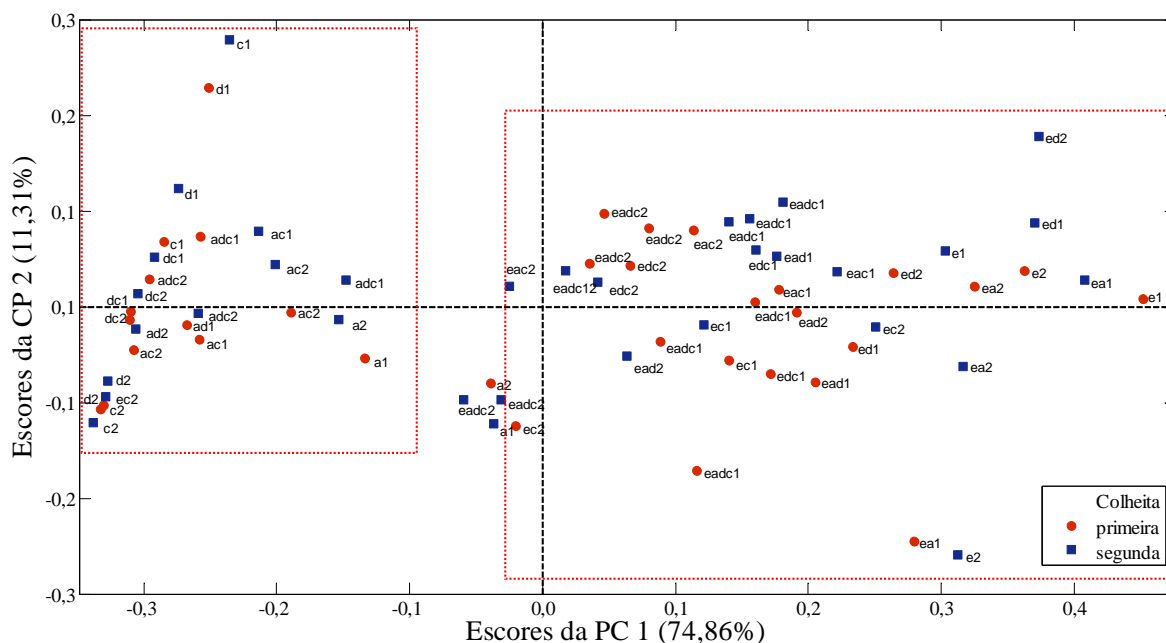


Figura 2 – Gráfico dos escores da PC_1 vs. PC_2 dos TACs obtidos por CLAE-DAD das folhas de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita de 2011 e 2012.

A partir dos *loadings* da CP_1 , Figura 3, podemos verificar os extratos brutos que foram extraídos com etanol ou mistura de solventes contendo etanol, Tabela 1, foram caracterizados pelas maiores alturas dos picos cromatográficos. Portanto, decidiu-se aplicar a MCR-ALS apenas para extratos preparados sem etanol ou que continha etanol na sua composição extratora.

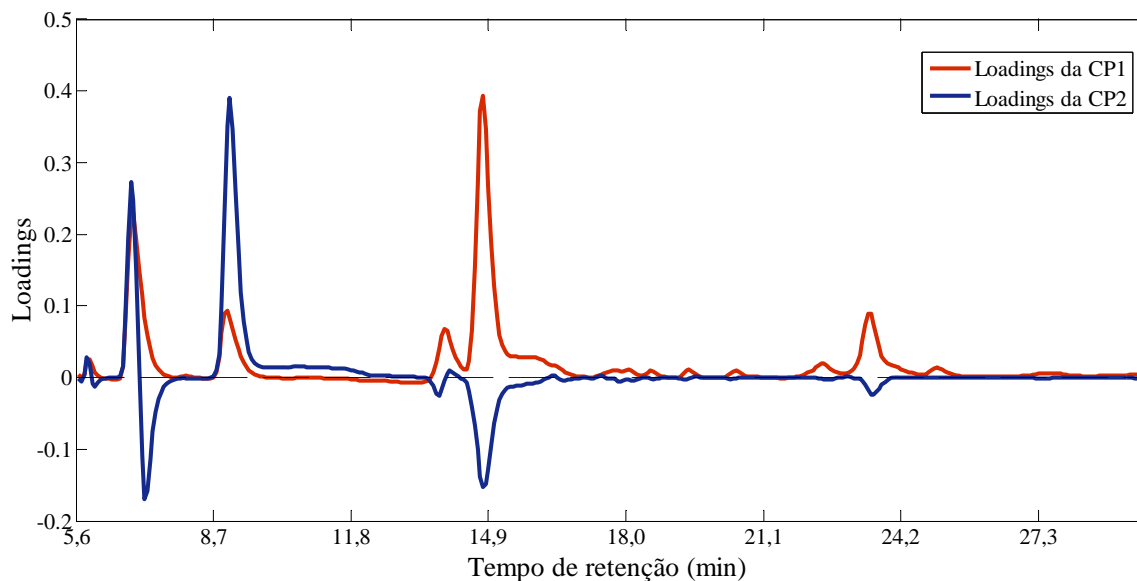


Figura 3 – Gráfico dos *loadings* da PC₁ vs. PC₂ dos TACs obtidos por CLAE-DAD das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita de 2011 e 2012.

Para a análise por Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS) as corridas cromatográficas foram subdivididas em seis janelas de eluição sem perderem informações, devido às diferentes formas e densidades de pico, como mostrado na Figura 1a. Cada janela cromatográfica (CLAE-DAD e CLAE-IES/EM) dos extratos das folhas da *C. sinensis* foi analisada simultaneamente com colunas e linhas aumentadas por MCR-ALS usando estimativas dos picos iniciais, não negatividade (em \mathbf{C} e \mathbf{S}^T) e em alguns dados unimodalidade (em \mathbf{C}). Primeiramente, os dados obtidos por CLAE-DAD foram analisados separadamente, ou seja, apenas a matriz aumentada por colunas. Essa análise também foi aplicada aos dados obtidos por EM. Posteriormente, os dados fundidos por linhas e colunas, ou seja, DAD-EM foram analisados simultaneamente. Para explicar adequadamente a variação de dados observados, foi utilizado geralmente um número maior de componentes ao MCR-ALS do que o número de metabólitos detectados. Assim, nem todos os componentes resolvidos por MCR-ALS correspondeu a picos cromatográficos relacionados com compostos químicos, uma vez que pode haver outras contribuições de sinais detectados,

tais como alterações no *background*, composição do solvente e oscilações do equipamento. Todos eles podem produzir mudanças na resposta do detector, o que exigirá um número extra de componentes bilineares no modelo MCR.

Análise por MCR-ALS da janela cromatográfica A utilizando CLAE-DAD e CLAE-IES/EMn (ou seja, com ionização *electrospray* no modo negativo), resolveu um único perfil de espectro com uma banda máxima de absorção no comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) em 269 nm e um sinal de EM indicando a presença de uma espécie iônica com m/z 305. No entanto, dois picos cromatográficos em 2,8 e 3,7 min apresentaram este perfil. A análise por MCR-ALS da matriz aumentada por linhas e colunas confirmou a presença de dois componentes. Nesse caso era esperado que o MCR-ALS resolvesse dois espectros na região do UV-Visível, mas isso não ocorreu devido ao fato de ambos os componentes apresentarem o mesmo perfil espectral UV e valores muito semelhantes de m/z nos seus espectros resolvidos. Segundo Rio et. al (2004)²⁵ esses dois espectros correspondem a galocatequina e epigalocatequina. O pico a 3,7 min tem uma concentração mais elevada do que em 2,8 min. De acordo com a literatura, a epigalocatequina é uma das catequinas mais abundantes presentes nas folhas de chá verde²⁶. Assim, os dois picos cromatográficos em 2,8 e 3,7 min foram atribuídos a galocatequina e epigalocatequina, respectivamente.

No caso da janela B (5,2 a 10,0 min), não houve picos coeluídos. A análise por MCR-ALS dos dados de CLAE-DAD e CLAE-IES/EMp resolveram um único pico com $\lambda_{\text{máx}}$ de 272 nm na região UV e m/z 195. Esse dois espectros são característicos da cafeína. O mesmo foi confirmado na análise da matriz supraumentada dos dados fundidos CLAE-DAD-IES/EMp. Esse composto foi confirmado utilizando o seu padrão analítico.

A resolução da janela cromatográfica C, usando dados obtidos por CLAE-DAD, apresentou três componentes coeluídos. A Figura 4 mostra os perfis de eluição de três componentes resolvidos em $\mathbf{C}_{kaum(DAD)N}$, para amostras de primeira e segunda colheita. Os dados de CLAE-IES/EMn, da mesma janela cromatográfica, também indicaram presença de três componentes e a análise dos dados fundidos de CLAE-DAD-IES/EMn confirmaram suas presenças. Nessa mesma Figura podemos observar os espectros de UV-Visível, $\mathbf{S}_{aum(DAD)N}^T$ da matriz $\mathbf{C}_{kaum(DAD)N}$. Como pode ser visto, os três espectros puros coeluídos foram bem resolvidos para os extratos.

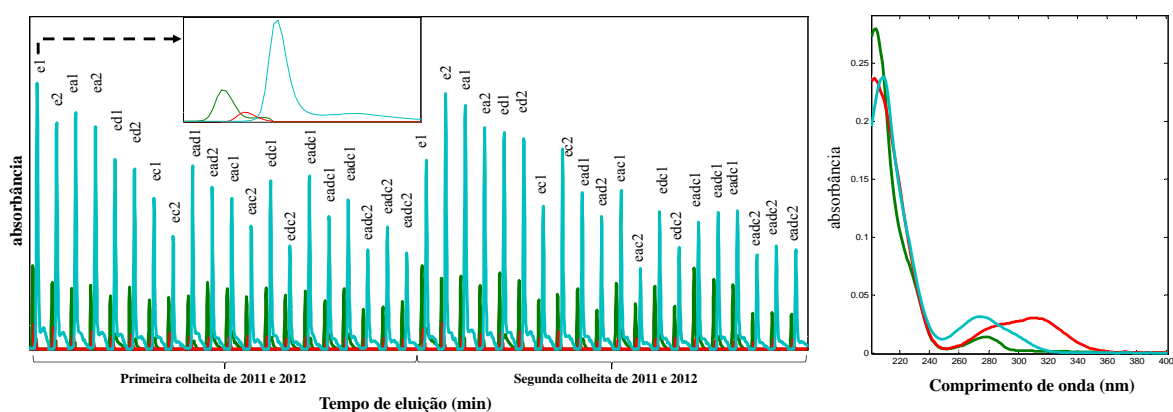


Figura 4—Perfis de eluição da matriz $\mathbf{C}_{c\ aum(DAD)}$ e espectros UV puros resolvidos por MCR-ALS analisando os extratos brutos, obtidos com etanol ou mistura de etanol no solvente extratorde primeira colheita de 2011, simultaneamente. *Zoom* no perfil cromatográfico do extrato bruto obtido por etanol puro.

O primeiro perfil com pico cromatográfico em 10,74 min apresentou uma banda de absorção máxima em 278 nm e m/z 289, que é característico de fragmentação padrão $[M-H]^-$ da epicatequina. Esse metabólito foi confirmado utilizando o seu padrão analítico. Um segundo perfil de eluição foi resolvido, possuindo pico cromatográfico máximo em 11,51 min, com λ_{\max} em 273 nm e m/z 457. Esses espectros são característicos da epigalocatequina galato, que também foi confirmado pela autenticação do padrão. Finalmente, entre os picos da epicatequina e epigalocatequina galato, um terceiro pico coeluído foi resolvido, no tempo de 11,00 min, com absorção máxima em

309 nm²⁷ e m/z 173, ao qual pode corresponder ao ácido 4-p-cumaroilquínico^{25,28-29}. Os três perfis espectrais resolvidos por MCR-ALS dessa janela cromatográfica podem ser observados por meio da Figura 5.

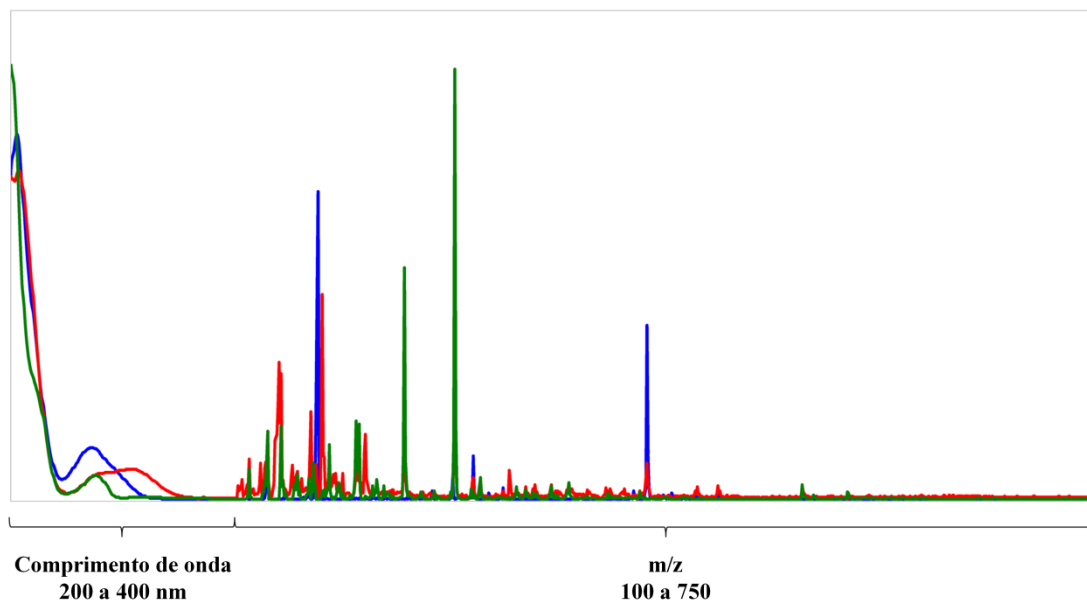


Figura 5 - Espectros puros resolvidos por MCR-ALS, matriz $S^T_{c \text{ aum(DAD-EMpN)}}$, dos dados fundidos da matriz aumentada por linhas e colunas dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* da janela C, contendo etanol na composição da mistura de solventes extratores.

A resolução dos dados de CLAE-DAD de multiconjunto da janela D mostrou a presença de outros três componentes espectrais UV diferentes em S^T , em contraste com os dados de CLAE-ESI/EMp da mesma janela cromatográfica que apontaram para a presença de cinco componentes. A análise da matriz de dados superaugmentada de CLAE-DAD-IES/EMp confirmaram a resolução de cinco compostos diferentes. Um maior número de componentes não conduziu a resultados mais interpretáveis, e um menor número de componentes produziu piores resultados. No entanto, o perfil cromatográfico resolvido indicou a possível presença de sete picos diferentes. Isso pode ocorrer porque alguns picos apresentaram praticamente o mesmo espectro na região UV e espectro EM extremamente semelhante (com valores de m/z igual ao nível de 1 amu

resolução). Os componentes presentes nessa janela de dados foram caracterizados como provenientes dos flavonóides, exceto o último pico. Espectros típicos de flavonóides exibem duas bandas de absorção máximas, uma entre 240 a 280 nm (banda II) e outra entre 300 a 550 nm, como confirmado pela literatura³⁰.

O primeiro perfil de eluição teve o seu pico máximo no tempo de 14,6 min, com bandas de absorção máxima em 270 e 335 nm, e o seu sinal em EM de $[M + H]^+$ de m/z 565. Esse componente pode corresponder a apigenina 6-C-pentosil-8-C-hexosídeo, um flavonoide já identificado em amostras de chá oolong³¹. Os próximos dois perfis de eluição, com picos máximos em 14,9 e 15,4 min, tiveram os mesmos perfis espectrais na região UV e m/z , ou seja, duas bandas em 264 e 354 nm as quais podem estar relacionadas com a miricetina-3-O-galactosídeo e miricetina-3-O-glucosídeo, com sinal de EM de m/z 319, ao qual pode referir-se a fragmentação $[M-162+H]^+$ (miricetina)³²⁻³³. Embora não estejam incluídos nesse conjunto de dados analisados, os espectros obtidos por ionização negativa mostraram um sinal de EM com fragmentação $[M-H]^-$ de m/z 479 que confere com os espectros dos dois compostos²⁸. O seguinte perfil eluído teve o seu pico registrado em 15,7 min, estando coeluído com outro pico em 15,4 min, tendo duas bandas de absorção de UV em 264 e 354 nm e um sinal de EM em m/z 504. Esse composto não pode ser identificado. O quinto e sexto perfil de eluição tiveram seus máximos em 16,3 e 17,4 min, com os mesmos espectros UV e m/z , ou seja, com as bandas UV máximas em 255 e 355 nm, que podem ser de quercetina-hexoses conjugadas, como a quercetina-3-glicosídeo tendo um sinal de fragmentação EM em m/z 303³⁰. O último componente dessa janela cromatográfica foi observado no tempo de eluição máximo de 17,9 min, apresentando $\lambda_{\text{máx}}$ em 268 nm e m/z 261 (não identificado).

A resolução dos dados fundidos de CLAE-DAD-IES/EMn (ionização negativa) da janela E foi conseguida utilizando cinco componentes. Um primeiro perfil de eluição teve o seu pico máximo em 18,9 min e duas bandas de absorção com máximos em 268 e 335 nm e um espectro EM com um sinal principal de m/z 431 e um fragmento adicional de m/z 311. Esse componente pode corresponder a apigenina-C-glucose de acordo com estudos anteriores³⁴⁻³⁵. Um segundo perfil de eluição em 19,9 min apresentou-se coeluído no tempo de eluição de 20,3 min, apresentando bandas de absorção em 263 e 353 nm e sinal principal m/z 463 e fragmento adicional em m/z 301. Esses espectros podem caracterizar a quercetina-galoil-hexosídeo, já identificada no chá verde³⁵. O pico registrado em 20,3 min foi resolvido, contendo uma banda de absorção máxima $\lambda_{\text{máx}}$ de 276 nm e m/z 441 com fragmentos de m/z 289 e 169, muito similares aos da epicatequina galato (ECG)^{25,36}. Os perfis de eluição em 19,3 e 21,9 minutos, apresentaram espectros de UV e EM semelhantes, isto é, o primeiro com bandas de absorção em 264 e 346 nm e o outro em 264 e 343 nm, com o sinal EM de m/z 755. Isso indica que esses compostos podem ser isômeros, mas eles não puderam ser identificados neste trabalho, devido à precisão de massa limitada (apenas 1 amu). A janela de dados entre 22,90 e 27,96 min (janela F) não contém informações espectrais e por isso não foi analisada.

Dificuldades na identificação de alguns compostos resolvidos são devido a limitações do equipamento de detecção de massa utilizado neste trabalho, com precisão de resolução de apenas 1 amu. Uma melhor identificação dos compostos seria obtida com espectrômetros de massa mais precisos, como *Time Of Flight* (TOF) e *Orbitrap* que fornecem valores de resolução em massa de 0,0001 amu.

A Figura 6a mostra os resultados de OSC-PLS-DA aplicadas às áreas de oito picos comuns selecionados, obtidos na análise anterior por MCR-ALS das amostras das

duas colheitas de 2011, analisadas por CLAE-DAD. A primeira variável latente (VL_1) foi responsável por 28,94% da variância dos dados em \mathbf{X} e 67,05% da variância em \mathbf{Y} . Esse resultado permite a discriminação da maior parte dos extratos brutos das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita. Os extratos brutos das folhas de segunda colheita estão localizados no lado positivo dos escores da VL_1 . De acordo com os *weights* positivos da VL_1 , as variáveis mais importantes correspondem aos metabólitos da epigalocatequina, cafeína, epicatequina e os dois compostos não identificados em 19,3 e 21,9 min (com bandas de absorção máximas em 264 e 346 nm, e 264 e 343 nm, respectivamente, e m/z 755). Compostos como epigalocatequina galato e epicatequina galato e o composto que acreditamos ser o ácido 4-p-cumaroilquínico, apresentaram valores de *weights* negativos sobre VL_1 e eles estão relacionados aos extratos de amostras de chá da primeira colheita, Figura 6a. Os escores do VIP superiores a 1 (um) foram obtidos para a epigalocatequina, cafeína e epicatequina. Esses compostos estimados são os que mostraram ter maiores poderes discriminatórios entre os extratos de amostras de chá da primeira e segunda colheita de 2011, Figura 6b.

Na investigação das colheitas de 2012, a mesma análise foi realizada. Conforme apresentado no gráfico dos escores da OSC-PLS-DA, Figura 6c, os dois primeiros componentes explicaram 52,10% da variância em \mathbf{Y} (62,39% variância em \mathbf{X}) e permitiu a separação entre os extratos de amostras de primeira e segunda colheita de chá. Metabólitos como a epigalocatequina, cafeína e epicatequina, apresentaram valores *weights* negativos na VL_1 , que também foram característicos dos extratos de primeira colheita. A epigalocatequina galato, epicatequina galato e um dos isômeros, não identificado, com perfil de eluição em 19,3 minutos tiveram *weights* com valores positivos na VL_1 e caracterizaram os extratos brutos das amostras de chá de segunda colheita. A epigalocatequina e cafeína apresentaram escores dos VIPs superiores a 1 e

permitiram uma boa discriminação entre os extratos de amostras de primeira e segunda colheita 2012, Figura 6d.

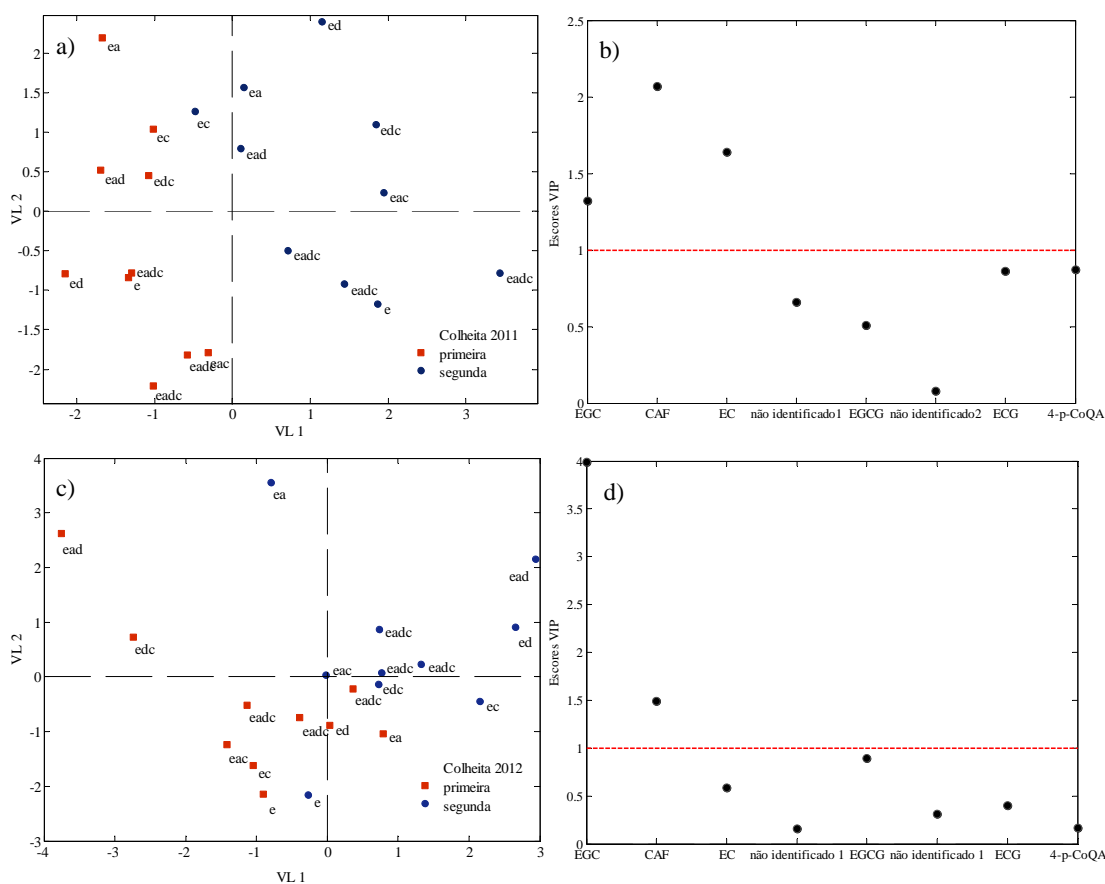


Figura 6 - Gráficos dos escores da OSC-PLS-DA (VL₁ vs. VL₂), das áreas dos picos resolvidos por MCR-ALS dos extratos que continham etanol na composição do solvente extrator das folhas da *C. sinensis* de primeira e segunda colheita de 2011 (a) e 2012 (b) e suas respectivas importâncias das variáveis na projeção (VIP) de 2011 (c) e 2012(d).

Baseado nos escores dos VIPs obtidos na análise por OSC-PLS-DA, com valores maiores que 1, a epigalocatequina e cafeína(que estão presentes em todas as amostras) tiveram os maiores poderes discriminatórios entre as amostras dos dois anos analisados e talvez poderiam ser usados como potenciais marcadores de colheitas. Extratos de amostras de chá das colheitas de 2011 tiveram maiores concentrações desses dois compostos na segunda colheita quando comparada aos de primeira.Uma possível explicação para este fato é que as plantas de chá passam por um novo estresse na

segunda colheita e isso talvez poderia acelerar os processos metabólicos para o crescimento das folhas. Porém, mais estudos são necessários para confirmar essa proposta. Pelo contrário, em 2012, os resultados foram opostos, com maiores concentrações desses dois metabólitos observados para os extratos de primeira colheita. Esse contraste de comportamento nas amostras de chá nas duas colheitas pode ser devido às temperaturas mais baixas que ocorreram em 2012, causando geada entre o período das duas colheitas. Isto pode sugerir que esses dois compostos podem ser usados como marcadores de possíveis efeitos de baixas temperaturas em metabolismos de plantas de chá.

CONCLUSÃO

Essa análise exploratória mostrou que a composição do solvente de extração afeta a eficiência da extração dos metabólitos. O conjunto de dados fundidos de CLAE-DAD e CLAE-IES/EM, em matrizes de dados aumentadas por linhas e colunas, analisadas simultaneamente por MCR-ALS forneceu uma estratégia confiável para a investigação e identificação dos metabólitos extraídos das amostras de *C. sinensis*. Os espectros puros de UV e EM resolvidos por MCR-ALS permitiu a identificação direta da maior parte dos metabólitos resolvidos. A identificação desses metabólitos poderia ser confirmada utilizando detectores de espectrometria de massa de alta resolução. A OSC-PLS-DA aplicada às áreas de pico dos perfis de eluição dos constituintes de chá resolvidos por MCR-ALS permitiu a separação entre as amostras de primeira e segunda colheita de dois anos analisados. Em ambos os anos, epigalocatequina e cafeína foram os compostos que apresentam maiores diferenças e que permitiram uma melhor discriminação entre as duas colheitas. Portanto, esses dois metabólitos de chá são

propostos como potenciais marcadores de qualidade das folhas da *C. sinensis*, uma vez que se mostraram sensíveis ao estresse como o de poda e temperatura.

REFERÊNCIAS

¹CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial effects of green tea - a review. *Journal of the American College of Nutrition*, v, 25, p. 79–99, 2006.

²MASOUM, S.; BEHPOUR, M.; AZIMI, F.; MOTAGHEDIFARD, M.H. Potentiality of chemometric approaches for the determination of (+)-catechin in green tea leaves at the surface of multiwalled carbonnanotube paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 193, p. 582-591, 2014.

³XU, R.; YE, H.; SUN, Y.; TU, Y.; ZENG, X. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 2473-2480, 2012.

⁴MAS, S.; CARBÓ, A.; LACORTE, S.; JUAN, A.; TAULER, R. Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 9260–9268, 2011.

⁵PERÉ-TREPAT, E.; HILDEBRANDT, A.; BARCELÓ, D.; LACORTE, S.; TAULER, R. Fast chromatography of complex biocide mixtures using diode array detection and multivariate curve resolution. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 74, p. 293-303, 2004.

⁶SALVATORE, E.; COCCHI, M.; MARCHETTI, A.; MARINI, F.; JUAN, A. Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques. *Analytical Chimica Acta*, v. 761, p. 34-45, 2013.

⁷JAUMOT, J.; GaARGALLO, R.; JUAN, A.; TAULER, R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 76, p. 101-110, 2005.

⁸**MATLAB** version R2008b, The Mathworks Inc., Mathworks, Manson, MA, USA.

⁹PERÉ-TREPAT, E.; TAULER, R. Analysis of environmental samples by application of multivariate curve resolution on fused high-performance liquid chromatography–diode array detection mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A*, v. 1131, p. 85-96, 2006.

¹⁰WOLD, S. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, p. 37-52, 1987.

¹¹EILERS, P.H.C. Parametric time warping. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 404-411, 2004.

- ¹²NIELSEN, N.P.V.; CARSTENSEN, J.M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A*, v. 805, p. 17-35, 1998.
- ¹³TOMASI, G.; BERG, F.; ANDERSON, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *Journal of Chemometrics*, v. 18, p. 231-241, 2004.
- ¹⁴SKOV, T.; BERG, F.; TOMASI, G.; BRO, R. Automated alignment of chromatographic data. *Journal of Chemometrics*, v. 20, p. 484-497, 2006.
- ¹⁵TAULER, R. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics*, v. 19, p. 31-58, 1995.
- ¹⁶CARNEIRO, R.L.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J.; TAULER, R. Multivariate curve resolution of pH gradient flow injection mixture analysis with correction of the Schlieren effect. *Analyst*, v. 133, p. 774-783, 2008.
- ¹⁷WINDIG, W. Self-modeling mixture analysis of spectral data with continuous concentration profiles. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 16, p. 1-16, 1992.
- ¹⁸BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, v. 17, p. 166-173, 2003.
- ¹⁹WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 58, p. 109-130, 2001.
- ²⁰ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *WIREs Computational Statistics*, v. 2, p. 97-106, 2010.
- ²¹FARRÉS, M.; PIÑA, B.; TAULER, R. Chemometric evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* metabolic profiles using LC-MS. *Metabolomics*, v. 11, p. 210-224, 2014.
- ²²WOLD, S.; ANTTI, H.; LINDGREN, F.; ÖHMAN, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 44, p. 175-185, 1998.
- ²³BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, v. 20, p. 341-351, 2006.
- ²⁴CHONG, I.G.; JUN, C.H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 78, p. 103-112, 2005.
- ²⁵DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; MULLER, W.; BURNS, J.; LEAN, M.E.J.; BRIGHENTI, F.; CROZIER, A. HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2807-2015, 2004.

- ²⁶EL-SHAHAWI, M.S.; HAMZA, A.; BAHAFFI, S.O.; AL-SIBAALI, A.A.; ABDULJABBAR, T.N. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 134, p. 2268–2275, 2012.
- ²⁷LIN, L.Z.; CHEN, P.; HARNLY, J.M. New Phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 8130-8140, 2008.
- ²⁸DOU, J.; LEE, V.S.Y.; TZEN, J.T.C.; LEE, M.R. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of Oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 7462-7468, 2007.
- ²⁹SAVIC, I.M.; NIKOLIC, V.D.; SAVIC, I.M.; NIKOLIC, L.B.; JOVIC, M.D.; JOVIC, M.D. The qualitative analysis of the green tea extract using ESI-MS method. *Advanced technologies*, v. 3, p. 30-37, 2014.
- ³⁰ATOUL, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v. 89, p. 27-36, 2005.
- ³¹LAYHER Jr., J.W.; POLING, J.S.; ISHIHARA, M.; AZADI, P.; ALVAREZ-MANILLA, G.; PUETT, D. A possible effect of concentrated Oolong tea causing transient ischemic attack-like symptoms. *British Journal of Medicine & Medical Research*, v. 3, p. 2157-2172, 2013.
- ³²HOSAKA, H.; MIZUNO, T.; IWASHINA, T. Flavonoid pigments and color expression in the flowers of Black Hollyhock (*Alcea rosea* 'Nigra'). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B*, v. 38, p. 69-75, 2012.
- ³³ZHAO, Y.; CHEN, P.; LIN, L.; HARNLY, J.M.; YU, L.L.; LI, Z. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. *Food Chemistry*, v. 126, p. 1269-1277, 2011
- ³⁴SIMIRGIOTIS, M.J. Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from southern Chile. *Molecules*, v. 18, p. 2061-2080, 2013.
- ³⁵SCOPARO, C.T.; SOUZA, L.M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra-high performance liquid chromatography assisted by liquid–liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion x reversed phase). *Journal of Chromatography A*, v. 1222, p. 29-37, 2012
- ³⁶YAO, L.; JIANG, Y.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DUAN, J.; RAYMONT, K.; LISLE, A.; XU, Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, v. 84, p. 253-263, 2004.



CONCLUSÃO

GERAL



CONCLUSÃO GERAL

Com a aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros UV-Visível foi possível obter a impressão digital e discriminar as folhas de *C. sinensis* de primeira e segunda colheita, mesmo havendo grande variação dos dados devido aos diferentes solventes utilizados na preparação dos extratos brutos. A cafeína e feofitina foram os metabólitos responsáveis pela distinção entre as colheitas. O diclorometano puro foi o melhor extrator para esses metabólitos.

Na extração das catequinas os resultados mostraram que as abundâncias relativas na segunda colheita foram ligeiramente maiores do que na primeira colheita, mas a diferença não foi significativa no nível de confiança de 95%. Abundância EGCG foi maior que o EGC, que foi maior do que para a EC para todas as misturas de solventes de extração. Abundâncias relativas mais elevadas de EC, EGCG e EGC seriam obtidas pela mistura binária de etanol:acetato de etila na proporção 70:30 (v/v). Já para os valores de IC_{50} mais baixos ocorreriam com uma proporção de 55:25:20 (v/v/v) de etanol:acetato de etila: diclorometano.

O conjunto de dados fundidos de CLAE-DAD e CLAE-IES/EM, em matrizes de dados aumentadas por linhas e colunas, analisadas simultaneamente por MCR-ALS forneceu uma estratégia confiável para a investigação e identificação dos metabólitos extraídos das amostras de *C. sinensis*. Os espectros puros de UV e EM resolvidos por MCR-ALS permitiram a identificação direta da maior parte dos metabólitos resolvidos. A OSC-PLS-DA aplicada às áreas de pico dos perfis de eluição dos constituintes de chá resolvidos por MCR-ALS permitiu a separação entre as amostras de primeira e segunda colheita de dois anos analisados. Em ambos os anos, epigallocatequina e cafeína foram os compostos que apresentam maiores diferenças e que permitiram uma melhor discriminação entre as duas colheitas. Portanto, esses dois metabólitos de chá são

propostos como potenciais marcadores de qualidade das folhas da *C. sinensis*, uma vez que se mostraram sensíveis ao estresse como o de poda e temperatura.

Em suma, esse trabalho nos mostrou que utilizando uma técnica bastante simples e de baixo custo como a espectroscopia UV-Visível, associada à ferramenta quimiométrica, foi possível a discriminação entre as colheitas da *C. sinensis*. No entanto, a técnica CLAE-DAD associadas aos métodos quimiométricos, fornece informações adicionais como a obtenção dos espectros UV-Visível de cada metabólito separado pela cromatografia e também fornece alguma informação sobre a sua estrutura. Já com as técnicas hífenadas como CLAE-DAD-IES/EM e métodos quimiométricos, é possível obter mais informações estruturais desses metabólitos.