

Marcella Loebler Nascimento

Bacharel em Nutrição

Pós-graduada em Nutrição Humana e Saúde

**Doseamento de Cafeína e Análise Sensorial de Chá Preto
(*Camellia sinensis*) Preparado com Diferentes Condições
de Extração**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Gastronómicas

Orientador: Prof. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa
Lourenço

Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Doutora Maria Paulina E. Neves da Mata

Professora Auxiliar, FCT/UNL

Setembro 2014

Doseamento de Cafeína e Análise Sensorial de Chá Preto (*Camellia sinensis*) Preparado com Diferentes Condições de Extração

Copyright © Marcella Loebler Nascimento, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois foi ele quem me colocou neste caminho e iluminou os meus passos até chegar a este ilustre momento. Deu-me saúde e força nos momentos necessários, sem deixar que eu fraquejasse.

À professora Ana Lourenço, por me ter orientado o trabalho com tamanha dedicação. Por tudo que me ensinou, desde a primeira orientação até o dia de hoje, pela motivação em dividir comigo seus conhecimentos e ter a humildade de me amparar nos momentos necessários. Seu apoio foi crucial para a realização deste trabalho e sou-lhe eternamente grata por isto.

À professora Paulina Mata, co-orientadora do trabalho, por apresentar-me este desafio de realizar este estudo, estando sempre dedicada e motivada com suas orientações. Por todos ensinamentos transmitidos ao longo do mestrado, seu empenho em nos ajudar sempre que necessário.

À Luz Fernandes, pelos ensinamentos que foram elementares para a realização deste trabalho. Não tenho palavras que agradeçam sua paciência, companheirismo, dedicação e motivação em sempre me auxiliar. Obrigada pela amizade que se formou em meio a tantas horas de trabalho ao meu lado.

A todos os funcionários do Laboratório de Análises REQUIMTE/FCT, disponibilizando o laboratório para utilização do equipamento e pelo apoio técnico prestado.

À professora Valdeni, Isabel e Juliano, da UFCSPA, que me receberam de portas abertas na Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre, dispostos a me orientar e auxiliar, fazendo com que este trabalho tivesse continuidade no Brasil.

Agradeço infinitamente a todos os meus familiares, meus avós, tios e primos, cada um de seu modo fez com que eu chegasse a este momento. Em especial agradeço à minha mãe, que é meu exemplo de força e dedicação. Sei o quanto foi difícil estes dois anos estando distante, mas em momento algum deixou de me apoiar e incentivar, obrigada por todo o seu amor.

A todos os meus amigos de longa data, que permanecem comigo nos momentos bons e não tão bons, o meu obrigado a todos vocês. Aos amigos que ganhei ao longo do mestrado, que me ajudaram em cada minuto desta vivência em Lisboa.

Gostaria por fim de agradecer a todos, que me apoiam diariamente e que acreditam no meu potencial.

RESUMO

A popularidade do chá preto (*Camellia sinensis*) mundialmente é indiscutível, principalmente por ser considerado como uma importante fonte de cafeína. No entanto a composição final da infusão consumida está fortemente associada ao seu modo de preparo.

Neste estudo realizado com chá preto Pekoe (Gorreana®, Açores, Portugal), quantificou-se o teor de cafeína em infusões de chá preparadas de diferentes formas através de cromatografia gasosa. Além disso, foi desenvolvida uma nova técnica de extração da cafeína a partir de infusões liofilizadas. As infusões com folhas de chá preto foram preparadas com a proporção folhas/água sugerida na embalagem (3 g de folhas de chá em 50 ml de água). Na preparação destas infusões foram utilizadas duas extrações consecutivas das folhas de chá preto em diferentes tempos de infusão (1, 3, 5 ou 20 minutos).

As infusões obtidas a partir primeira extração das folhas de chá preto foram analisadas através cromatografia gasosa e as seguintes quantidades de cafeína estavam presentes: 2,60 mg, 2,98 mg, 3,14 mg e 54,32 mg, para os tempos de infusão de 1, 3, 5 e 20 minutos, respectivamente. Para a segunda extração das folhas de chá foram quantificados os seguintes valores de cafeína (mg / 3 g de folhas): 0,52 mg, 0,10 mg, 0,14 mg e 0,20 mg para os tempos de infusão de 1, 3, 5 e 20 minutos respectivamente.

As diferenças entre os resultados demonstram que a diferença mais expressiva de teor de cafeína nas infusões se observa entre amostras obtidas de extrações sucessivas. A diferença do tempo de extração tem um impacto bastante inferior devido à elevada solubilidade da cafeína em água quente. A aplicação de um teste de análise sensorial apresentou a opinião do consumidor sobre as infusões de chá analisadas, demonstrando a preferência e superioridade das amostras obtidas através da 1ª extração da folha de chá em relação aos atributos avaliados.

Esta informação pode ser bastante relevante para o consumidor, pois permitirá com base na técnica de preparação do chá, e por um processo simples, ajustar o conteúdo de cafeína.

Palavras-chave: chá preto, *Camellia sinensis*, cafeína, cromatografia gasosa, análise sensorial

ABSTRACT

The popularity of black tea (*Camellia sinensis*) around the world is indisputable, mainly for being considered as a major source of caffeine. However, the infusion final composition to be consumed is strongly linked to its mode of preparation.

In this study with Pekoe black tea (Gorreana, Açores, Portugal) was quantified the caffeine content in tea infusions prepared in different ways by gas chromatography. In addition, a novel technique for extracting caffeine from lyophilized infusions was developed. The black tea leaves' infusions were prepared with the proportion leaf / water as suggested by the manufacturer (3 g of tea leaves / 50 ml of water). When preparing these infusions, two consecutive extractions from black tea leaves at different infusion times (1, 3, 5 or 20 minutes) were used.

Infusions obtained from the black tea leaves first extraction were analyzed by gas chromatography and the following caffeine amounts were present: 2.60 mg, 2.98 mg, 3.14 mg and 54.32 mg for infusion times 1, 3, 5 and 20 minutes, respectively. For the second tea leaves extraction the following amounts of caffeine were measured (mg / 3 g of leaves): 0.52 mg, 0.10 mg, 0.14 mg and 0.20 mg for 1, 3, 5 and 20 minutes of infusion times, respectively.

Differences among the results demonstrate that the most relevant difference of caffeine content from infusions was observed between samples from successive extractions. The difference in the extraction time has a much lower impact due to the high solubility of caffeine in hot water. The application of a sensory analysis test presented the consumer opinion about the analyzed tea infusions, demonstrating the preference and superiority of the samples obtained from first leaves tea extraction as regards all evaluated attributes.

This information can be quite relevant for the consumer as it will allow adjust the caffeine content based on the tea preparation technique from a simple process.

Keywords: black tea, *Camellia sinensis*, caffeine, gas chromatography, sensory analysis.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xvii
CAPÍTULO 1– INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO 2. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Camellia sinensis	3
2.1.1. Uma breve história do chá	4
2.1.2. Produção e consumo	5
2.1.3. Chá da Gorreana	6
2.2. Chá preto.....	8
2.2.1. Composição do chá preto.....	9
2.2.2. Chá e cafeína.....	11
2.2.3. Preparação do chá preto.....	14
2.3. Métodos para quantificação de cafeína	15
2.3.1. Cromatografia gasosa	19
2.4. Análise sensorial em chás	21
2.4.1. Testes - Testes afetivos	23
2.4.1.1. Teste de preferência	23
2.4.1.2. Teste de escala hedônica	24
2.4.2. Condições necessárias para aplicação da análise sensorial	25
CAPÍTULO 3. - MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Preparação da amostra	27
3.1.1. Materiais.....	27
3.2. Método.....	28

3.2.1. Procedimento da primeira extração da folha.....	28
3.2.2. Procedimento da segunda extração da folha.....	28
3.2.3. Liofilização.....	28
3.2.4. Procedimento de extração com clorofórmio.....	29
3.3. Análise Cromatográfica.....	30
3.3.1. Calibração.....	31
3.3.2. Condições cromatográficas (1ª e 2ª extração da folha).....	34
3.4. Análise sensorial do chá preto.....	35
3.4.1. Elaboração das amostras para análise sensorial.....	35
3.4.2. Análise sensorial.....	35
3.4.3. Análises estatísticas.....	36
3.4.4. Considerações éticas.....	36
CAPÍTULO 4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Otimização dos processos.....	37
4.1.1. Otimização do método de extração.....	37
4.1.2. Otimização dos processos cromatográficos.....	38
4.2. Quantificação da cafeína nas infusões de chá resultantes da 1ª e 2ª extração da folha de chá.....	41
4.2.1. Doseamento da cafeína.....	42
4.3. Resultados da análise sensorial.....	46
4.3.1 Resultados do teste de escala hedônica.....	49
4.3.2. Resultados do teste de preferência.....	50
4.3.3. Consumo de chá pelos provadores.....	52
CAPÍTULO 5. - CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Composição de um típico chá verde e chá preto, obtidos através da fervura das folhas (valores de percentagem relativamente ao extrato seco p/p).....	10
Tabela 2 - Principais componentes do chá preto. Componentes medidos em percentagem (% do peso seco de sólidos de extrato).	11
Tabela 3 - Composição determinada do extrato de metanol (70%) de folhas de chá preto de diferentes proveniências.	13
Tabela 4 - Conteúdo de cafeína em diferentes tipos de chás afetados pela temperatura da água e extrações. Os valores são expressos em mg/l \pm SD (n = 3).	18
Tabela 5 - Conteúdo de metilxantinas (teobromina, teofilina e cafeína) em chá preto afetadas pela temperatura da água e extrações. Os valores são expressos em mg/l \pm SD (n = 3).....	18
Tabela 6 - Seleção de compostos responsáveis pelo sabor e odor no chá preto.	23
Tabela 7 - Escala para avaliação hedônica	25
Tabela 8 - Dados para elaboração da curva de calibração para doseamento das amostras de 1ª extração de cafeína.	32
Tabela 9 - Dados para elaboração da curva de calibração para doseamento das amostras de 2ª extração de cafeína.	33
Tabela 10 – Resultados finais da quantificação de cafeína presente nas amostras referentes a 1ª e 2ª extração da folha de chá.	34
Tabela 11 – Doseamento da cafeína presente nas amostras referentes a 1ª extração da folha de chá.	43
Tabela 12 – Doseamento da cafeína presente nas amostras referentes a 2ª extração da folha de chá.	43

Tabela 13 - Quantificação de cafeína na 1^a e 2^a extração (ext.) da folha de chá a diferentes tempos de extração da folha em concentração (Conc.) em mg de cafeína / 3 g de folha e em percentagem.44

Tabela 14 – Média dos atributos sensoriais avaliados através do teste de escala hedônica de nove pontos em amostras de infusões de chá preto, n=25.6

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - a) Plantações de <i>Camellia sinensis</i> ; b) Folha e flor de <i>Camellia sinensis</i>	4
Figura 2 - a) Os chineses Lau-a-Pan, mestre manipulador e Lau-a-Teng, interprete (fotografia, ca. 1878). b) Plantação de chá (fotografia, primeira metade do século XX). c) fábrica da Gorreana (fotografia, primeira metade do século XX).	6
Figura 3 - a) Fábrica da Gorreana; b) Variedades de chá da marca Gorreana.	7
Figura 4 – Plantação de chá da Gorreana.	7
Figura 5 – Etapas de fabricação dos chás, preto, verde, oolong.	9
Figura 6 – Estrutura da xantina	13
Figura 7 – Estrutura química da cafeína (a), teofilina (b) e teobromina (c).....	14
Figura 8 – Infusão de chá elaborada com diferentes águas.	15
Figura 9 - Conteúdo de cafeína de chás e chás mate determinados por quatro métodos diferentes (a - isolamento com clorofórmio; b - micrométodo; c - método com acetato de chumbo; d - HPLC).	17
Figura 10 – Cromatografia Gasosa detetor de ionização de chama (GC-FID).....	20
Figura 11 - Estrutura química da lupanina.	21
Figura 12 – Exemplo de teste de preferência.	24
Figura 13 – a) Chá preto da Gorreana Pekoe; b) Folhas de chá preto da Gorreana Pekoe	27
Figura 14 – Liofilização das amostras.	29
Figura 15 – Extração com clorofórmio das amostras liofilizadas.	30
Figura 16 – Cromatógrafo da marca Konik, modelo Konik HRGC 4000B	31

Figura 17 – Curva de calibração referente à 1ª extração da folha.	32
Figura 18 – Curva de calibração referente à 2ª extração da folha.	33
Figura 19 – Cromatograma de uma amostra padrão para ilustração dos tempos de retenção da cafeína e lupanina.	41
Figura 20 – Mesa apresentada aos provadores para realização da análise sensorial (1º dia)...	47
Figura 21 – Mesa apresentada aos provadores para realização dia de análise sensorial (2º dia).	47
Figura 22 - Amostras do primeiro dia de análises sensoriais, amostras 1.1, 1.2, 3.1, 3.2	48
Figura 23 – Amostras do segundo dia de análises sensoriais, amostras 5.1, 5.2, 20.1, 20.2. ..	48
Figura 24 – Resultados do teste de preferência entre as amostras de chá preto avaliadas no primeiro dia de testes, n=25.	51
Figura 25 – Resultados do teste de preferência entre as amostras de chá preto avaliadas no segundo dia de testes, n=25.	52
Figura 26 – Consumo de chá preto pelos participantes da análise sensorial, n=50.	53

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CE - Eletroforese Capilar (*Capillary electrophoresis*)

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

DDSME – Microextração por solvente gota a gota (*Drop-To-Drop Solvent Microextraction*)

DMS - Diferença Mínima Significativa

FID - Detetor de Ionização de Chama (*Flame Ionization Detector*)

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GC-MS - Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

GC-C-IRMS – Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas por interface de Combustão (*Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry*)

GC-FID - Cromatografia Gasosa - Detetor de Ionização de Chama (*Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*)

PI – Padrão Interno

ppm – Parte por milhão

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLC/MS - Cromatografia Em Camada Delgada/Espectrometria de Massa (*Thin layer chromatography/mass spectrometry*)

1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O chá com suas diversas características conquistou o mundo, modificou costumes, ganhou grandes admiradores e mudou economias. Por suas propriedades benéficas à saúde, ou por sua riqueza de sabores e aromas, o chá é bebido pelos quatro cantos do mundo. Esta bebida de grande popularidade é feita a partir da infusão de folhas de *Camellia sinensis*, tendo grande importância mundialmente, tanto socioeconômica como cultural (Lima *et al.* 2009).

Em contraste com alguns países asiáticos, como China e Índia, onde beber chá é um ritual e um estilo de vida, em muitos países europeus o consumo de chá não é frequente e as pessoas ainda preferem vários tipos de infusões de frutas e ervas, como por exemplo, camomila, cidreira e tília. No consumo de chá também difere o tipo de chá e a sua preparação. Habitualmente, em algumas partes do mundo, o chá é infundido várias vezes, realizando-se extrações repetidas ou preparadas com água em temperaturas diferentes (Horžic' *et al.* 2009).

Astill *et al.* (2001) comprovaram que as variáveis de preparação tem um efeito marcante sobre a composição da bebida final, o que é importante, pois a qualidade e as propriedades da bebida consumida estão associadas aos componentes químicos, em particular os polifenóis e cafeína extraídos a partir da folha.

A cafeína é um alcalóide presente em sementes, folhas e raízes de algumas plantas, como o café (*Coffea arabica*), chá (*Camellia sinensis*) e o cacau (*Theobroma cacao*). Possui estrutura química de metilxantina tal como os outros alcalóides que co-ocorrem nestas espécies vegetais, como por exemplo, a teobromina e a teofilina. Estes pertencem a uma categoria de alcalóides com propriedades bioativas que exibem efeitos farmacológicos atuando no sistema nervoso central, coração, sistema nervoso periférico, rins, tracto gastrointestinal e sistema respiratório (Komes *et al.* 2009). Devido ao grande consumo de cafeína através dos alimentos, é de grande importância a sua quantificação.

A motivação para o presente estudo foi o fato de termos verificado que muitos consumidores consideram que o teor de cafeína está diretamente relacionado com o tempo de infusão e, portanto infusões mais curtas permitirão obter uma bebida com menor teor de

cafeína. O estudo propõe-se quantificar, utilizando a cromatografia gasosa, a cafeína presente em infusões de folhas de chá preto Pekoe da Gorreana (Açores), obtidas seguindo o processo de preparação referido no rótulo do produto comercial. Propõe-se ainda comparar esse valor com os de chás obtidos com o mesmo produto, mas com diferentes tempos de infusão e métodos de preparação.

O presente trabalho pretende:

- i. Quantificar a cafeína presente em infusões de folhas de chá preto, reproduzindo o modo como o consumidor os prepara.
- ii. Quantificar e comparar a quantidade de cafeína em chás resultantes de diferentes tempos e métodos de extração: tempos de 1, 3, 5 e 20 minutos, realizados a partir da 1ª e 2ª extração da folha de chá preto Pekoe da Gorreana.
- iii. Estabelecer um método prático e eficaz de extração de cafeína do chá com vista à sua quantificação.
- iv. Estabelecer um método de quantificação de cafeína através da cromatografia gasosa.
- v. Avaliar, através de análise sensorial, a percepção dos consumidores relativamente aos chás preparados pelos diferentes métodos.
- vi. Transformar os resultados da avaliação dos chás em informação útil para o consumidor.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Camellia sinensis*

A planta de onde são obtidas as folhas de chá, *Camellia sinensis*, é originária do sul da China e do sudeste asiático, mas é atualmente cultivada em mais de trinta países. A planta do chá cresce na forma de um arbusto verde de pequeno porte em áreas com condições de cultivo adequadas, temperatura ótima no intervalo de 15 a 20 °C, e elevada umidade e precipitação anual (Li, *et al.* 2007).

Há duas principais variedades da planta, a variedade conhecida como *Camellia sinensis*, que é cultivada nas regiões montanhosas e frias da região central da China e do Japão. E a variedade conhecida como *Camellia sinensis* var. *assamica*, que foi descoberta em Assam (Índia), apresentando folhas maiores (Harbowy *et al.* 1977; Lin *et al.* 2003). Esta cresce melhor em climas úmidos e tropicais característicos do nordeste da Índia e das províncias *Szechuan* e *Yunnan* da China.

Atualmente a *Camellia sinensis* tem-se propagado, hibridizado e cultivado através de sementes e estacas, visando estes métodos manter a pureza da planta, gerando clones e acelerando o estabelecimento de novas plantações de chá. O processo inicia-se com a plantação em viveiros, onde as plantas se desenvolvem em sementeiras num período de seis meses. As sementeiras são em seguida transplantadas para os campos (Harbowy *et al.* 1977). Os arbustos são podados com frequência, para estimular o crescimento da folha e inibir o desabrochar da flor, raramente ultrapassam os 90 cm de altura, isto, para facilitar a colheita. A poda é essencial para manter os arbustos de chá em uma condição controlável para a colheita e melhorar a produção através do aumento da ramificação (Ravichandran & Parthiban, 1998a). A Figura 1 (a) exhibe o momento de uma colheita de chá nos Açores. A planta apresenta folhas simples, alternadas, inteiras, com margem serrada e textura coriácea, como se visualiza na Figura 1 (b).



a)

b)

Figura 1 - a) Plantações de *Camellia Sinensis*; b) Folha e flor de *Camellia Sinensis*

Fonte: a) (Almeida, 2013) b) (Jorge, s.d.)

2.1.1. Uma breve história do chá

Muita história circula em torno da origem desta bebida. De acordo com a mitologia chinesa o imperador Shenung, denominado Imperador dos Cinco Grãos e Agricultor Divino, estava a descansar perto de uma árvore bebendo água fervida, quando o vento depositou algumas folhas de *Camellia sinensis* em sua chávena. O imperador bebeu a infusão, extasiado com o sabor do chá, logo a tornou sua bebida preferida, popularizando-a nos quatro cantos da China e sendo-lhe atribuída a descoberta do chá (Gracindo, 2013).

Porém não se pode afirmar ao certo a data do surgimento do chá. A primeira referência documentada na China ocorreu na dinastia Han (206 a.C.- 220 d.C). Nela foram reconhecidas suas propriedades medicinais, que ao longo dos anos a ciência vem a confirmar. A grande ascensão do consumo de chá iniciou-se na dinastia Tang (618 – 907), saindo dos palácios e mosteiros, e tornando-se muito popular entre os chineses. Desde então o chá evoluiu passando de medicamento, tempero, ou moeda de troca, a uma bebida refinada e desejada (Gracindo, 2013).

O chá preto surgiu na dinastia de Ming (1368 – 1644) e foi nesta época que começou a ser consumido. Durante o transporte nas viagens longas o chá em folhas verdes fermentava muito facilmente, alterando e comprometendo negativamente o seu sabor. Assim viu-se a necessidade de desenvolver outro processo de transformar o chá, que atendesse à demanda exterior, surgindo assim o chá preto (Gracindo, 2013). Ainda na dinastia Ming o uso medicinal de chá foi gravado na antiga farmacopeia chinesa *Ben Cao Gang Mo*, escrito por Shi- Zheng Li (Lin *et al.*, 2003).

Por volta de 1500 o chá era comercializado em Veneza. A mais antiga menção na literatura europeia sobre o chá aparece no *Chai Catai* (Chá da China) em 1559, capítulo do livro *Delle Navigatione et Viaggi* escrito por Giambattista Ramusio. Portugal começou também a explorar o chá em Macau e em 1610 a Real Companhia Marítima Portuguesa das Índias enviou o seu primeiro carregamento de chá para a Europa. Contudo a negociação entre chineses e portugueses foi complicada (Gracindo, 2013).

Com a grande produção e comércio de chá, ele difundiu-se rapidamente por toda a Europa. A Infanta portuguesa D. Catarina de Bragança, filha de D. João IV, que casou no ano de 1662 com Carlos II de Inglaterra levou seu gosto pelo chá, introduzindo-o na corte inglesa (Macfarlane e Macfarlane, 2005). O consumo aumentou muito na Inglaterra, de 10 toneladas em 1700, para 10 mil toneladas em 1800 (McGee, 2011). Foi este o início de um processo que o tornou uma bebida tradicional em todo país no século XIX, na era Vitoriana, e popular noutros países. Hoje é considerado a seguir à água, a bebida não alcoólica mais consumida no mundo (Joshi *et al.* 2013).

2.1.2. Produção e consumo

De acordo com a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2012), a produção de chá no mundo (preto, verde e oolong) atingiu os 4,1 milhões de toneladas em 2010. A produção de chá preto aumentou 5,5%, enquanto a produção de chá verde aumentou 1,9% em relação ao ano de 2009. O crescimento da produção mundial foi devido a grandes incrementos na produção nos dois maiores países exportadores de chá preto: Quênia em 18% e Sri Lanka em 13%. Também foi impulsionado pelo rápido crescimento nos níveis de poder de compra *per capita*, particularmente na China, na Índia e em outras economias emergentes. Segundo a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (2012) o crescimento da demanda foi particularmente proeminente na China.

A China continua a ser o maior produtor de chá com uma produção de 1,4 milhões de toneladas, o que representa 33% do total mundial, enquanto na Índia, o segundo maior produtor, a produção tem diminuído e alcançou o valor de 0,97 milhões de toneladas em 2010 (FAO, 2012). Com o aumento da população mundial espera-se que o mercado de chá deva continuar a crescer.

O consumo de chá preto ocorre principalmente nos países ocidentais e em países do sul da Ásia, como Índia e Sri Lanka, enquanto os chás verde e oolong são consumidos principalmente nos países do leste asiático, como a China, Japão e Taiwan (Chan *et al.* 2011).

2.1.3. Chá da Gorreana

Em 1874 chegaram aos Açores, mais precisamente na Ilha de São Miguel, as primeiras sementes de *Camellia sinensis*. Alguns anos mais tarde, em 1878, foram chamados dois especialistas chineses (figura 2a)) trazidos pela Sociedade Promotora da Agricultura Micaelense que se dedicaram a ensinar aos produtores locais as técnicas de preparação das folhas (Pascoal & Sousa, 2012). Muitas plantações funcionaram na Ilha de São Miguel com produção independente e, entre elas, a Gorreana e Porto Formoso foram as que permaneceram até à atualidade (figura 2 b) e c)).

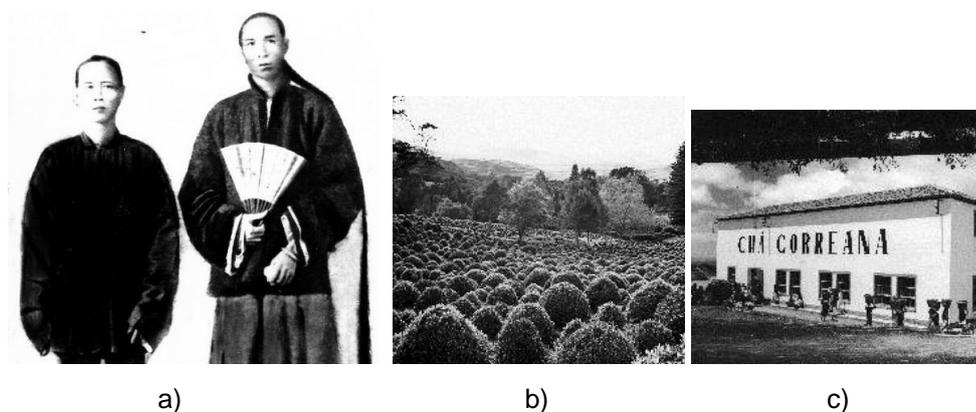


Figura 2 - a) Os chineses Lau-a-Pan, mestre manipulador e Lau-a-Teng, interprete (fotografia, ca. 1878). b) Plantação de chá (fotografia, primeira metade do século XX). c) fábrica da Gorreana (fotografia, primeira metade do século XX).

Fonte: (Pascoal & Sousa, 2012)

Fundada por D. Ermelinda Gago da Câmara, a Gorreana iniciou a sua produção em 1883, data em que obteve o primeiro quilo de chá seco, manufaturado a partir de folha produzida nas suas plantações (Pascoal, 2012). A fábrica (Figura 3 a)) funciona ininterruptamente desde o ano de abertura, mantendo as tradições orientais de cultivo, produzindo chá preto, das variedades Orange Pekoe, Broken Leaf e Pekoe, e chá verde da variedade Hysson (figura 3 - b)).



a)



b)

Figura 3 – a) Fábrica de Gorreana; b) Variedades de chá marca Goreana.

Fonte: a) (Mata, s.d.); b) (Alma Lusa, 2012)

O chá Gorreana e o chá Porto Formoso são os únicos chás produzidos comercialmente na Europa, porém a seu espaço comercial é relativamente reduzido se comparado com outras marcas disponíveis no mercado. A plantação possui atualmente 32 hectares, produzindo cerca de 33 toneladas por ano (Figura 4). Sendo os Açores a única região europeia onde se produz chá, a maior parte de sua produção é destinada ao consumo em Portugal, exportando também para países europeus, EUA e Canadá (Gorreana, 2011).



Figura 4 – Plantação de chá da Gorreana.

Fonte: (Mata, sd.).

2.2. Chá preto

Existem três tipos principais de chá em consequência da forma de preparação: chá preto, chá oolong e chá verde. Em particular distingue-os a ocorrência e extensão de reações de oxidação (processo denominado em geral por fermentação, mas que em rigor não corresponde a um processo de fermentação, mas apenas a oxidação enzimática) e a forma de processamento das folhas. Os processos de fabricação dos diferentes tipos de chá estão resumidos na Figura 5 (McGee, 2011). O chá preto é o mais processado e sujeito a maior oxidação. O chá oolong é parcialmente oxidado. O chá verde sofre muito pouco processamento e não sofre reações de oxidação, pois há uma inativação enzimática inicial. Na produção mundial de chá verifica-se uma distribuição aproximada de 78% de chá preto, 20% de verde e 2% de oolong (Khan & Mukhtar, 2007).

A folha de chá fresca tem um sabor adstringente e amargo, não apresenta praticamente nenhuma outra nota de sabor. O chá preto é resultado de uma “fermentação” profunda, ou seja, de transformações enzimáticas dos sucos presentes na folha. Durante o processamento as folhas são murchadas durante horas. Após o emurchamento, as folhas passam pelo processo de “rolagem”, onde são pressionadas para romper a estrutura de seus tecidos e liberar os fluídos celulares. Permanecem então em repouso entre 1 h e 4 h. Nesta etapa a ação enzimática irá proporcionar ao chá a cor cobre e o sabor rico e frutado. As folhas por fim são secas por meio de ar quente a uma temperatura próxima dos 100 °C, o que irá torná-las bem mais escuras (McGee, 2011). O chá preto tem uma composição diferente das folhas frescas devido às transformações por oxidação ou polimerização, e ainda a outras modificações de componentes originais que ocorrem durante o processamento (Yamanishi *et al.* 1995).

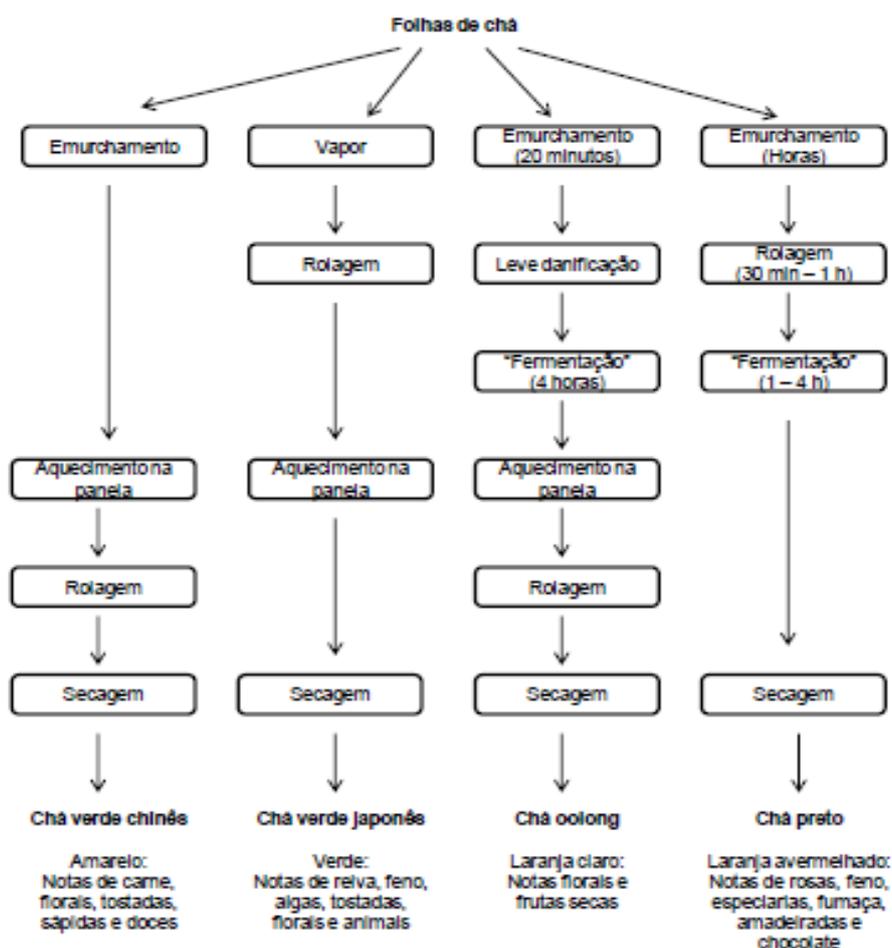


Figura 5 – Etapas de fabricação dos chás, preto, verde, oolong.

Fonte: McGee (2011).

2.2.1. Composição do chá preto

A composição do chá varia com a espécie, local de cultivo, época, idade da folha, clima e práticas de horticultura (Astill *et al.*, 2001). Mas a forma de processamento tem também um peso determinante que se reflete nas características dos diferentes chás que foram referidos. A Tabela 1 adaptada de Harbowy *et al.* (1997), apresenta uma composição química aproximada do extrato sólido do chá preto e verde, os extratos foram obtidos através da fervura das folhas de ambos os chás, demonstrando a diferença da composição que há entre os dois tipos de chá.

O período de atividade enzimática vai ter essencialmente dois efeitos. Um é a libertação de uma vasta gama de compostos voláteis, responsáveis pelo aroma, que na folha intacta estão ligados a moléculas de açúcar. Esta libertação confere aos chás oolong e preto

aromas mais ricos e complexos do que os dos chás verdes. A segunda transformação resulta de reações de polimerização dos compostos fenólicos. As catequinas iniciais, que são amargas, adstringentes e incolores, são transformadas, devido à oxidação pela polifenol oxidase, em teaflavinas, com cores vermelho alaranjadas, menos amargas, e responsáveis pelo sabor adstringente, e tearubiginas, com cor acobreada, menos amargas e menos adstringentes (Graham, 1999, Ngure *et al.*, 2009, McGee, 2011).

Tabela 1 - Composições típicas de chá verde e de chá preto, obtidos através da fervura das folhas (valores de percentagem relativamente ao extrato seco p/p).

	Chá verde	Chá preto
Catequinas	30%	9%
Teaflavinas	-	4%
Polifenóis simples	2%	3%
Flavonóides	2%	1%
Outros polifenóis	6%	23%
Teanina	3%	3%
Aminoácidos	3%	3%
Peptídeos/proteína	6%	6%
Ácidos orgânicos	2%	2%
Açúcares	7%	7%
Outros hidratos de carbono	4%	4%
Lípidos	3%	3%
Cafeína	3%	3%
Outras metilxantinas	<1%	<1%
Potássio	5%	5%
Outros minerais	5%	5%

Adaptado de: Harbowy *et al.* (1997).

Os componentes químicos importantes que influenciam o sabor, aroma e outras propriedades do chá preto, e outros chás fermentados, são os polifenóis, a cafeína, os açúcares, os ácidos orgânicos, compostos de aroma voláteis e aminoácidos. Os compostos fenólicos do chá, como teaflavinas e tearubinas, são muito importantes do ponto de vista da qualidade intrínseca, já que são responsáveis pela cor, sabor e brilho de chá. Sabe-se também que as variações de qualidade química ocorrem devido à variação na composição genética das plantas, mesmo quando elas são cultivadas em condições semelhantes num dado ambiente (Owuor *et al.* 2008).

A composição do chá preto é fortemente influenciada pelo processo tecnológico de sua produção, tornando-se impossível a existência de uma composição rígida, já que varia de acordo com diferentes preparações, além de variações que naturalmente existem pelo facto de ser um material de origem vegetal. É comum encontrar na literatura valores diferentes para a análise em percentagem dos componentes do chá preto. Harold & Graham (1992), sugerem que o chá pode ser elaborado ocorrendo a extração com proporção de 1 grama de folha para 100 ml de água. Normalmente obtendo um extrato seco correspondendo a de 0,30 – 0,35% do peso seco da amostra de folha. Deste modo os autores elaboraram suas amostras para análise e obtiveram em sua pesquisa sobre a composição do chá preto os valores que se apresentam na Tabela 2, e que pelas razões referidas em alguns casos diferem dos da Tabela 1.

Tabela 2 - Principais componentes do chá preto. Componentes medidos em percentagem (valores de percentagem relativamente ao extrato seco p/p).

Catequinas	3 – 10
Teaflavinas	3 – 6
Tearubinas	12 – 18
Flavonóides	6 – 8
Compostos fenólicos	10 – 12
Aminoácidos	13 – 15
Metilxantinas	8 – 11
Hidratos de carbono	15
Proteínas	1
Minerais	10
Compostos voláteis	<0,1

Adaptado de: Harold & Graham (1992).

2.2.2. Chá e Cafeína

De todas as substâncias químicas que alteram o comportamento humano, a cafeína é a mais consumida (McGee, 2011). Todos os tipos de chá possuem cafeína, variando a quantidade de acordo com o tipo. Devido à presença de cafeína o chá era consumido pelos monges budistas para mantê-los atentos enquanto meditavam (Gracindo, 2013).

O fato da cafeína estar presente numa grande variedade de plantas causou uma grande popularidade destas ao longo do tempo. As fontes mais importantes de cafeína são o café (*Coffea spp*), o chá (*Camellia sinensis*), o guaraná (*Paullinia cupana*), o mate (*Ilex paraguariensis*), a noz de cola (*Cola vera*) e o cacau (*Theobroma cacao*) (Komes, 2009). A quantidade de cafeína encontrada nestes produtos varia. Os montantes mais elevados são encontrados no guaraná (4-7%), seguida por folhas de chá (3,5%), folhas de chá mate (0,89-

1,73 %), café em grão (1,1-2,2%), nozes de cola (1,5%) e cacau (0,03%). Estes valores são referentes ao peso seco das amostras (Clifford *et al.* 1990).

A cafeína possui diversas funções nas plantas. Uma delas é atuar como um pesticida natural. Algumas plantas, incluindo folhas de *Camelia sinensis*, produzem metabolitos secundários, que são compostos orgânicos que estão envolvidos na defesa das plantas contra patógenos invasores, como é o caso de insetos, bactérias, fungos e vírus. No caso de folhas de chá, estes metabolitos incluem as catequinas, teaflavinas e alcalóides como a cafeína e as outras metilxantinas (Friedman *et al.* 2005). As altas concentrações de cafeína em folhas jovens, frutos e botões florais de espécies como *C. arabica* e *C. sinensis* agem como uma defesa para proteger os tecidos jovens de patógenos e herbívoros (Ashihara *et al.* 2008).

Um exemplo de defesa química da cafeína ocorre quando plantas de chá são atacadas por besouros do tipo *Xyleborus fornicatus*, os quais fazem buracos e galerias pela planta. Este ataque causa danos na estrutura do arbusto de chá, uma perda de rendimento de folhas e também faz com que os arbustos se tornem mais vulneráveis a ataques de outras pragas. Isto é muitas vezes seguido de infecção do caule através do fungo, *Monacrosporium ambrosium*, um simbionte do besouro. O crescimento do fungo é inibido pela cafeína e tem sido proposto que a acumulação de cafeína na folha que decorre após ataque do besouro pode ser uma estratégia de defesa de plantas (Kumar *et al.* 1995).

A cafeína do chá é a principal responsável pela sua ação estimulante do sistema nervoso e outros efeitos biológicos. Eleva o humor, diminui a fadiga, alivia a tensão, relaxa a musculatura lisa, músculo bronquial e também atua como um diurético (Mukhopadhyay *et al.* 2003). Cinco minutos após o consumo, a cafeína pode ser detectada em todo o corpo humano, atingindo o seu máximo depois de 20 a 30 minutos. A cafeína é metabolizada no fígado e tem tempo de meia vida de cerca de 3 a 6 horas, não se acumulando no corpo. A ingestão de cafeína em excesso pode causar vários sintomas desagradáveis incluindo a irritabilidade, dores de cabeça, insônia, diarreia, palpitações do coração. Além dessas funções a cafeína forma complexos com as teaflavinas, que modificam o sabor e adicionam frescor à bebida. Estes complexos contribuem para formação de um precipitado colorido quando a infusão do chá preto é resfriada (Obanda & Owour, 1995). Sobre a teobromina é relatado que ela é capaz aumentar a taxa de metabolismo, enquanto que a teofilina é um broncodilatador (Sharma & Rao, 2009).

A concentração de cafeína no chá ou café depende de vários fatores, incluindo a espécie da folha do chá ou da semente do café, local de cultivo, granulações da amostra, entre outros. Segundo Astill *et al.* (2001), resumem-se na Tabela 3 os valores encontrados de catequinas, polifenóis e cafeína de chás pretos originários de diferentes locais de cultivo. A composição da folha foi determinada pela análise total dos extratos. Estes foram preparados por extração com metanol de folha seca moída.

Tabela 3 - Composição determinada do extrato de metanol (70%) de folhas de chá preto de diferentes proveniências.

País de origem	Nº de exemplares	% cafeína
África	10	3,20
Argentina	1	2,41
China	3	2,53
Índia (Assam)	16	3,69
Índia (Darjeeling)	5	3,06
Índia (sul)	2	2,80
Indonésia	5	2,92
Sri Lanka	10	3,06
Vietnam	3	3,61

Adaptado de: Astill *et al.* (2001)

A cafeína caracteriza-se por ser um pó branco, cristalino, com sabor muito amargo, sem cheiro e com aspeto brilhante. A fórmula molecular da cafeína é $C_8H_{10}N_4O_2$ e o seu peso molecular é de 194,19. É um alcalóide, um composto contendo nitrogénio que apresenta propriedades básicas. Estruturalmente a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma purina, pertencendo ao grupo estrutural das xantinas (Figura 6), tal como as teofilina e teobromina (Figura 7). A solubilidade da cafeína em água é elevada e varia muito com a temperatura.

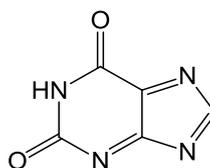


Figura 6 – Estrutura de xantina.

Um grama de cafeína dissolve-se em 46 ml de água à temperatura ambiente, em 5,5 ml a 80 °C, e em 1,5 ml à temperatura de ebulição. Um grama de cafeína dissolve-se em 5,5 ml de clorofórmio à temperatura ambiente, o que corresponde a uma solubilidade mais de oito vezes superior em clorofórmio do que em água.

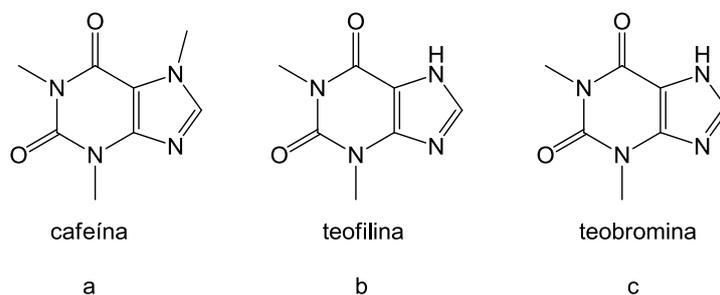


Figura 7 – Estrutura química da cafeína (a), teofilina (b) e teobromina (c).

2.2.3. Preparação do chá preto

O modo como o chá é preparado varia de acordo com o local em que é consumido. Oriente e Ocidente possuem formas distintas de prepará-lo. Fatores que variam são, por exemplo, a relação massa de folha / volume de água, a temperatura da água, a agitação usada para auxiliar a extração, o tempo de infusão das folhas e a utilização de ingredientes adicionais (Astill *et al.* 2001).

Em geral, os países ocidentais bebem maior quantidade de chá preto, feito por uma infusão de uma quantidade de folhas (normalmente contido em um saquinho de chá) em água fervente, em uma panela, bule ou, cada vez mais, em copo ou caneca. O tempo de infusão é geralmente curto (< 3 minutos) e a bebida é normalmente consumida quente (com ou sem leite e/ou açúcar) (Astill *et al.* 2001). Harold McGee refere em seu livro, *Comida & Cozinha – Ciência e Cultura da Culinária* (2011), que no Ocidente, a infusão geralmente é feita com uma quantidade relativamente pequena de folhas de chá preto, uma colher de chá pequena (2 a 5 g) para uma chávena (180 ml). As folhas são colocadas em infusão uma única vez e depois descartadas.

Segundo Astill *et al.* (2001) na Índia, Paquistão e alguns países do Médio Oriente, a bebida é preparada fervendo as folhas em uma panela por alguns minutos antes do consumo, muitas vezes em conjunto com água, leite e açúcar.

Tradicionalmente na China ocorre uma cerimônia em torno do chá, onde a primeira infusão é utilizada apenas para despertar as folhas e aquecer o bule e as chávenas, as infusões seguintes serão as apreciadas. As folhas podem ser utilizadas várias vezes, porém a cada vez devem permanecer em infusão por mais tempo (Gracindo, 2013).

A qualidade do chá é muito influenciada pela qualidade da água utilizada, embora grande parte dos sabores desagradáveis e dos compostos de cloro presentes quando é

preparado com água canalizada, sejam eliminados pelo processo de fervura. Água rica em carbonato de cálcio e magnésio possui vários efeitos indesejáveis no chá, como a formação de uma película superficial de precipitado composto pela associação entre os íons cálcio e compostos fenólicos (McGee, 2012). A Figura 8 ilustra um mesmo chá elaborado com águas diferentes, podendo-se observar a diferença entre a qualidade das duas infusões e a película superficial referida anteriormente.



Figura 8 – Infusão de chá elaborada com águas com diferentes composições em sais.

Fonte: (April 5 advertising architects, s.d.)

A água ideal para o chá tem conteúdo moderado de minerais e pH próximo do neutro, resultando uma preparação final com um pH em torno de 5, de modo a apoiar e equilibrar os outros sabores (McGee, 2011). A temperatura da água varia de acordo com o tipo de chá a ser preparado. Para o chá preto especificamente a temperatura usada é em torno dos 99 °C (Gracindo, 2013).

2.3. Métodos para quantificação de Cafeína

Em estudos epidemiológicos e alguns estudos de intervenção¹, a quantidade de chá, estimada a partir do número de copos consumidos, é frequentemente utilizada como um indicador do consumo de cafeína. No entanto, isso pode fornecer uma medida enganosa deste consumo, devido a alterações introduzidas pelos diferentes métodos de preparação do chá. Os efeitos na composição química do chá, preparado por infusão de folhas de chá, da relação água/chá, do tempo de infusão e do fato de se realizar uma ou mais extrações, é de grande interesse. Pois a qualidade e os efeitos fisiológicos da bebida consumida estão associados aos

componentes químicos (em particular os polifenóis e cafeína) extraídos a partir da folha (Astill *et al.* 2001).

Na literatura vários métodos são descritos para a extração e quantificação de cafeína. Os ingredientes ativos dos chás, principalmente catequinas e cafeína, são geralmente isolados por extração com solventes orgânicos, onde as condições de extração como a temperatura, tempo de extração, pH, proporção de solvente e folhas de chá irão influenciar a eficiência da extração e a qualidade dos extratos finais (Perva-Uzunalic´ *et al.* 2005).

Têm sido propostos vários métodos analíticos para quantificar a cafeína em bebidas e alimentos com base em espectrofotometria de ultra-violeta, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), cromatografia em camada delgada/espectrometria de massa (TLC/MS) e eletroforese capilar (CE). Os métodos espectrofotométricos envolvem um processo tedioso, e os passos de pré-tratamento da amostra são laboriosos e demorados, além de em muitos casos haver a possibilidade de interferências na quantificação, por exemplo, interferência da teobromina e da teofilina (Srivivas & Wu, 2007).

Segundo Lin *et al.* (2003), a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) apresenta um alto desempenho na determinação de polifenóis de chá e cafeína em folhas e flores de chá. Lin *et al.* (2003), avaliaram os níveis de cafeína em flores de chá, coletadas de dez espécies diferentes de *Camellia sinensis* por um processo de HPLC isocrático, utilizando etanol como solvente de extração. Os resultados apresentados são referentes a 1 g do extrato seco de flores ou folhas secas, extraídos em etanol a 75% a 60 °C durante 30 min. Concluíram que o nível de cafeína variou de 3 a 8 mg/g nas flores. Em folhas de vários tipos de chás os teores de cafeína variaram entre 23 mg/g (folhas frescas de chá) e 49 mg/g (chá preto). Em particular neste estudo o chá preto apresentou uma média de seu teor de 46,27 mg/g. Estes resultados demonstram que a cafeína está mais presente nas folhas de chá do que nas flores e que no chá preto o valor é dos mais elevados.

Um estudo realizado por Hicks *et al.* (1996) avaliou o conteúdo das metilxantinas (cafeína, teobromina, e teofilina) em oito tipos de chás. Estes incluíram dois chás pretos (saquetas Lipton e folhas asiáticas), dois chás oolong (dois tipos de folhas de chá oolong formosa, ambos de Taiwan), dois chás verdes (saquetas Lipton e folhas de chá verde coreana), e dois chás herbais (Lemon Mist da marca Celestial Seasoning e maçã com canela). Foram realizadas três infusões de cada um dos tipos de chá. Cada infusão ocorreu durante 5 minutos, sendo as folhas colocadas em água fervente. As saquetas e as folhas soltas de chá preto e verde continham aproximadamente a mesma quantidade, (2,3 a 2,5 g) e foram colocadas em 177 ml de água. A quantidade de chá oolong para a extração aconteceu de acordo com as instruções do rótulo, que se calculou ser 3,5458 g para 177 ml. As análises ocorreram diretamente com as infusões de chá pelo método de HPLC. Com base no peso da folha seca, obteve-se como resultado uma cafeína total maior em chás verdes (36,6 mg/177 ml), seguido pelo chá preto (32,8 mg/177 ml) e menor chá oolong (23,8 mg/177 ml). A teobromina total foi

maior em chá preto (1,64 mg/177 ml nas saquetas e 1,69 mg/177 ml em folhas soltas) e menor no oolong (0,65 mg/177 ml Formosa 1 e 0,71 mg/177 ml Formosa 2).

As infusões de ervas não apresentaram cafeína e teobromina. A teofilina não foi detetada em nenhuma das amostras destas infusões de chás pelo método utilizado, com isso Hicks *et al.* (1996) concluíram que a concentração é inferior a 0,1 mg/177 ml de bebida.

Relativamente aos teores de cafeína entre as infusões (1^a, 2^a e 3^a) de todos os tipos de infusões analisados, verificou-se que a média global de extração foi 69%, 23%, e 8%, respectivamente, relativamente à quantidade total de cafeína extraída com as três infusões.

Komes *et al.* (2009) utilizaram quatro métodos diferentes para a determinação da cafeína em cinco tipos de chá (branco, amarelo, verde, oolong e preto) e dois tipos de chá mate (mate verde e chá mate torrado): extração com clorofórmio, micrométodo com extração com benzeno, método com acetato de chumbo e um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras base, para os três últimos métodos, foram preparadas inicialmente da mesma maneira. A 2,5 g de chá foram adicionados 200 ml de água em ebulição e agitados durante 10 minutos. Os extratos foram filtrados através de algodão e diluídos com 250 ml de água destilada. No caso da extração com clorofórmio a proporção usada foi de 20 g de folhas para 90 ml de água aquecidos a refluxo por 30 minutos. Foi efetuada uma filtração e as folhas sujeitas a um segundo refluxo. Estes extratos foram em seguida processados de forma diferente, consoante ao método utilizado.

O conteúdo de cafeína dos cinco chás e dois chás mate determinada pelo procedimento de extração com clorofórmio variou de 0,69% no chá preto, para 1,33% no chá branco. Comparando os métodos utilizados para a determinação do teor de cafeína, verificou-se que o micrométodo com extração com benzeno exibiu os valores mais elevados (Figura 9). O chá branco continha o maior teor de cafeína (4,55%) e o chá mate o menor (1,05%). O conteúdo de cafeína através do micrométodo com extração com benzeno variou de 2,04% no chá verde para 3,86% no chá preto. O micrométodo espectrofotométrico provou ser a melhor alternativa para a determinação de teor de cafeína, exibindo os resultados mais semelhantes à análise de HPLC.

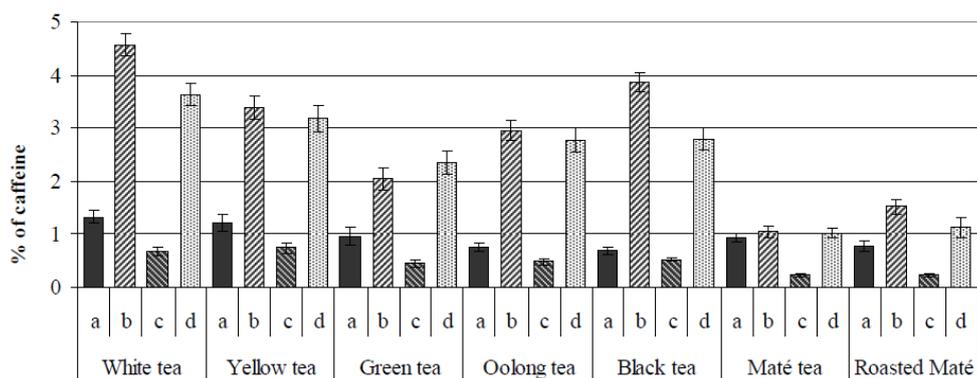


Figura 9 - Conteúdo de cafeína de chás e chás mate determinados por quatro métodos diferentes (a - isolamento com clorofórmio; b - micrométodo; c - método com acetato de chumbo; d - HPLC).

Fonte: Komes *et al.* (2009)

Horžic' *et al.* (2009), compararam o conteúdo de polifenóis e metilxantinas em chás e infusões de ervas e determinaram o efeito de diferentes condições de extração (temperatura da água e múltiplas extrações). As amostras de chás foram preparadas utilizando um procedimento de extração aquosa, 2,0 g de cada amostra de chá foi vertida em 200 ml de água. As temperaturas das extrações foram de 60, 80, e 100 °C, com um tempo de infusão de 3 minutos para todas as temperaturas. Para estudar o efeito de múltiplas extrações realizaram-se três extrações com as mesmas condições, temperatura de 80 °C durante 3 minutos de infusão. Para identificação e quantificação das metilxantinas presentes utilizou o método de HPLC. O teor mais elevado de cafeína em todos os chás foi verificado com a extração a 100 °C, sendo o maior valor encontrado no chá branco, seguido do oolong, chá verde e com valor inferior o chá preto (Tabela 4). A extração a 100 °C também se mostrou mais eficaz na extração das demais metilxantinas, onde ocorreram as maiores extrações (Tabela 5).

Tabela 4 - Conteúdo de cafeína em diferentes tipos de infusões de chás – efeito da temperatura da água e extrações múltiplas. Os valores são expressos em mg/l ± SD (n = 3).

	Chá branco	Chá verde	Oolong	Chá preto
60 °C	106,54 ± 2,09	234,25 ± 1,89	110,69 ± 1,45	116,97±1,07
80 °C (1ª extração)	197,79 ± 2,71	296,86 ± 2,12	155,80 ± 0,79	183,97±3,20
2ª extração	134,54 ± 2,12	124,29 ± 1,78	105,67 ± 1,33	117,54±1,18
3ª extração	75,46 ± 1,54	42,54 ± 0,81	54,81 ± 0,66	62,48±1,07
100 °C	335,05 ± 1,78	309,30 ± 2,32	316,18 ± 2,15	293,97±3,03

Adaptado de: Horžic' *et al.* (2009).

Tabela 5 - Conteúdo de metilxantinas (teobromina, teofilina e cafeína) em infusões de chá preto - Efeito da temperatura da água e extrações múltiplas. Os valores são expressos em mg/l \pm SD (n = 3).

	Teobromina	Teofilina	Cafeína	Total
60 °C	36,44 \pm 0,79	5,65 \pm 0,08	116,97 \pm 1,07	159,06
80 °C (1ª extração)	45,08 \pm 0,35	6,07 \pm 0,07	183,97 \pm 3,20	235,12
2ª extração (80°C)	23,28 \pm 0,54	n.d.	117,54 \pm 1,18	140,82
3ª extração (80°C)	9,03 \pm 0,23	n.d.	62,48 \pm 1,07	71,51
100 °C	45,93 \pm 0,29	9,27 \pm 0,09	293,97 \pm 3,03	349,17

n.d.- não detectado

Adaptado de: Horžic´ *et al.* (2009).

Strahl *et al.* (1977) concluíram que a aplicação de cromatografia gasosa para a análise de cafeína, em volumes pequenos de amostras de cafés e chás permite realizar determinações rápidas com alta reprodutibilidade e especificidade numa ampla gama de teores de cafeína.

Srivas & Wu (2007), utilizaram um método simples e rápido para a determinação quantitativa de cafeína em uma gota de bebidas e alimentos por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS). Para a extração foi proposto o uso de um processo de microextração por solvente (DDSME - *drop-to-drop solvent microextraction*), sendo o clorofórmio o solvente utilizado. Em relação à recuperação de cafeína, previamente adicionada, em bebidas e alimentos foram obtidos resultados iguais ou superiores a 96,6%, o que mostra uma boa fiabilidade deste método.

Foi ainda desenvolvida uma metodologia utilizando GC para a determinação dos valores de cafeína extraída de folhas de chá. O protocolo de análise inclui a extração de cafeína de folhas secas de chá com infusão em água a 96 °C durante 10 minutos, e extração de cafeína a partir da solução aquosa, utilizando clorofórmio. A medição dos valores de cafeína presentes nos extratos de clorofórmio ocorreu utilizando GC-C-IRMS (Wu *et al.* 2012).

2.3.1. Cromatografia gasosa

A aplicação de cromatografia gasosa para a análise da cafeína, em volumes pequenos de amostras de cafés e chás tem várias vantagens relativamente a outros métodos tal como acima se referiu. Em particular, a especificidade e sensibilidade do método cromatográfico de determinação de níveis baixos cafeína, parece oferecer vantagens sobre o método espectrofotométrico (Strahl *et al.* 1977).

Na cromatografia gasosa seguida de detecção por detector de ionização de chama (GC-FID), as amostras são injetadas (aproximadamente 1 μL) manualmente ou com injetor automático. A amostra é arrastada pela fase móvel, através de um gás de arraste (hélio, hidrogênio, nitrogênio, ou argônio) ao longo da coluna cromatográfica que contém a fase estacionária. A separação é efetuada ao longo da coluna em função do comportamento de cada analito relativamente às duas fases, estacionária e móvel com a aplicação de programas de temperaturas. Os compostos saem da coluna dissolvidos no gás de arraste, e passam pelo detector FID, onde serão produzidos íões e eletrões produzindo um sinal elétrico no aparelho. A partir deste sinal pode quantificar-se o composto a ser analisado sendo o composto identificado com base no tempo de retenção na coluna. A Figura 10 ilustra este processo detalhado acima.

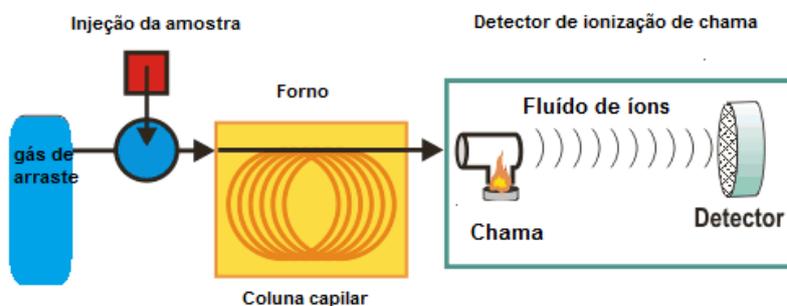


Figura 10 – Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID)

Adaptado de: (ETS Laboratories, 2014)

Para a quantificação através da cromatografia gasosa, utiliza-se o método de adição de padrão. O método consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a uma quantidade constante de um padrão. De acordo com Krull & Swartz (1998), a substância usada como padrão deve ter tempo de retenção diferente do analito e não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra. Após as análises cromatográficas dessas soluções, os cálculos são efetuados em função de uma curva de calibração que relaciona a razão de áreas (área da substância/área do padrão de concentração constante) com a razão das concentrações (concentração da substância/concentração do padrão). Pela determinação das razões das áreas da amostra incógnita calcula-se o valor da concentração da substância na amostra. A utilização do padrão deve-se à necessidade de eliminar erros de doseamento. Uma vez que os dados registrados e que são utilizados no doseamento são uma razão de leituras equivalentes, verifica-se a anulação de erros o que permite a fiabilidade do método.

No presente estudo de quantificação de cafeína utilizou-se a lupanina (Figura 11) como padrão. Este alcalóide produzido por plantas do gênero *Lupinus ssp.* está amplamente distribuído na natureza, aproximadamente trezentas espécies são encontradas na região do Mediterrâneo, África e América do Sul. Conhecido como tremçoço, é uma leguminosa. Na Europa, especialmente as espécies *L. albus* e *L. luteus* são utilizadas como forragem verde, como adubo ou são destinadas à alimentação humana. A lupanina foi escolhida para ser utilizada como padrão por ser um alcalóide como a cafeína e apresentar um tempo de retenção suficientemente diferente para que não haja interferência cromatográfica com qualquer componente da amostra.

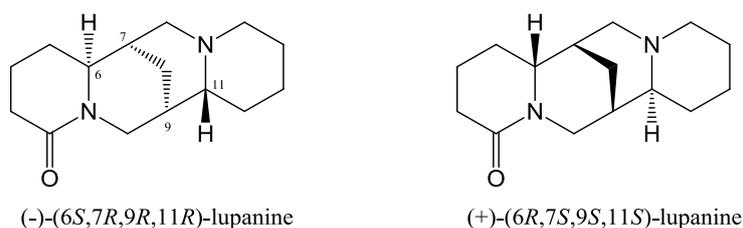


Figura 11 - Estrutura química dos dois enantiômeros da lupanina.

2.4. Análise sensorial em chás

A “análise sensorial” é importante desde a descoberta do fogo. Durante o período Paleolítico, o nomadismo do “Homem caçador-recolector” sustentava a sobrevivência, mas no Neolítico o sedentarismo do “Homem agricultor”, contribuiu para a abundância de alimentos e para o surgimento de preferências alimentares, condicionadas pelo clima, local, tribo, classe social, tabus culturais ou religiosos (Esteves, 2009).

Pode definir-se análise sensorial como a disciplina da ciência usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos e materiais tal como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tacto e audição (IFT, 1981). Segundo o projeto de Norma Portuguesa 4263 (1994) podemos definir Análise Sensorial ou Exame Organoléptico como o “exame das características organolépticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”, onde organoléptico é entendido como o que “qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos” (Noronha, 2003).

Para a análise sensorial, "gosto", "aroma", "sabor", "*flavour*" ou "*flaveur*" não são sinônimos. As sensações relacionadas simplesmente com o paladar designam-se gostos. Os compostos voláteis dos alimentos perceptíveis pelo olfato, por via retronasal, determinam o aroma. As sensações mais complexas, que associam a estimulação dos gomos gustativos e células receptoras olfativas, e dos elementos tácteis e térmicos da língua e cavidade oral

constituem o sabor. O conceito de análise sensorial que engloba, pelo menos, dois fenômenos, o gosto e o aroma, é denominado "*flavour*" ou "*flaveur*" (Esteves, 2009).

O gosto é um dos fatores sensoriais de grande importância para decidir a qualidade dos alimentos. Embora seja tipicamente avaliado por uma sensação gustativa, o teste sensorial pode ser potencialmente afetado por preferência individual, por condições físicas e mentais (Hayashi *et al.* 2013).

Para o chá preto, apesar de o processo de oxidação ser considerado chave para a definição da qualidade, outros fatores influenciam a qualidade do chá tais como variação genética e condições ambientais e de cultivo (Obanda e Owuor, 1997). Liang *et al.* (2003) sugerem que um bom chá deve ter bons atributos de qualidade individuais. Vários atributos podem ser compensados através da mistura, por exemplo, um bom chá pode ser obtido pela mistura um chá de paladar forte e aroma fraco com um chá de paladar fraco e aroma forte. É por esta razão que o fabricante muitas vezes combina no seu chá especial materiais produzidos a partir de várias origens e épocas.

Quando se avalia a qualidade do chá preto, são considerados o sabor, o aroma e a força da solução (Bhattacharyya *et al.* 2007), além dos atributos físicos e físico-químicos, tais como cor, textura, quantidade de resíduos, tipo e grau de enrolamento das folhas, teor de sólidos solúveis, viscosidade e densidade (Borse *et al.* 2002). Até ao momento, os chamados "Tea Tasters", degustadores de chá, são os responsáveis por avaliarem os chás de maneira subjetiva (Bhattacharyya *et al.* 2007) pois não se conhece com precisão quais os compostos químicos e as características da solução que mais se correlacionam com a qualidade do chá preto (Owuor *et al.* 2006), nem foram desenvolvidos métodos para determinação da qualidade do chá (Liang *et al.* 2003). Porém Owuor *et al.* (2006) concluíram que para os chás pretos quenianos o parâmetro brilho da solução estava associado com a qualidade.

Liang *et al.* (2002) referem que a qualidade do chá preto depende, principalmente, dos componentes e das cores das infusões de chá. Esta qualidade tem sido tradicionalmente avaliada por provadores de chá que desenvolveram uma linguagem própria para descrever os vários atributos de uma infusão de chá de qualidade. Esta linguagem é, por vezes, difícil de compreender pelos consumidores. Os mesmos autores referem que é necessário o desenvolvimento de métodos objetivos (químicos e físicos) para identificar a qualidade do chá (Liang *et al.* 2002).

No caso de infusões, como as de *Camellia sinensis* (chá verde, oolong e chá preto), o sabor determina a qualidade do produto e o seu preço de mercado, evidenciando a importância do conhecimento das vias bioquímicas de geração dos compostos voláteis, que são em grande parte responsáveis pelo aroma, e que sofrem alterações durante o processamento (Ravichandran e Parthiban, 1998b; Kato e Shibamoto, 2001).

Os componentes químicos importantes que influenciam o sabor e aroma incluem compostos aromáticos voláteis. Vários compostos voláteis de aroma são reportados no chá

preto. Os compostos com maior impacto relativamente ao odor e sabor estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Seleção de compostos responsáveis pelo sabor e odor no chá preto.

Composto	Sabor	Odor
Linolol	Doce	Cítrico/limão
Geraniol	Floral	Rosas
Fenil acetaldéido	Floral	-
Benzaldéido	Frutado	Amêndoas
Salicilato de metilo	Frutado	Menta
Fenil etanol	Frutado	Mel
Hexanal	Gramíneo/verde	Frescor

Adaptado de: Arctander (1969); Burdock (2004).

2.4.1. Testes afetivos

A análise sensorial de produtos alimentares é muito importante, pois fornece indicações fundamentais para a produção e comercialização dos produtos, no tocante às preferências e exigências do consumidor. Uma dessas indicações é a nota média de aceitação atribuída a cada uma das propriedades, como cor, aroma, sabor e aparência de um produto, ou de diferentes marcas, ou ainda de variações de um produto (Silva & Azevedo, 2009).

Testes afetivos são provas sensoriais usadas para a valorização ou classificação da preferência e/ou aceitação dos produtos por provadores sem treino prévio, selecionados de entre consumidores de acordo com critérios que variam com o objetivo do teste (área geográfica, tipo de ocupação, nível social e econômico). Estes testes sensoriais permitem descrever, simultaneamente, várias características num ou mais produtos. Aos provadores são fornecidas escalas para avaliarem a intensidade das sensações provocadas pelos atributos e/ou para "apreciarem" os produtos e demonstrarem a sua preferência (Esteves, 2009). Segundo Ferreira *et al.* (2000), os testes afetivos são uma importante ferramenta, pois acessam diretamente a opinião do consumidor sobre um produto ou ideias sobre o mesmo.

Entre os testes afetivos podemos classificar os testes por ordem de gosto, como teste de preferência e teste de escala hedônica. Os resultados de testes afetivos, tradicionalmente são avaliados por ANOVA e testes de comparação de médias, comparando-se a aceitação média entre produtos (Esteves, 2009).

2.4.1.1. Teste de preferência

O teste de preferência pode ser considerado como uma das mais importantes etapas da análise sensorial. Representa o somatório de todas as percepções sensoriais e expressa o julgamento, por parte do consumidor, sobre a qualidade do produto. Mede a preferência, para prever a aceitabilidade (Dutcosky, 1996).

Neste tipo de prova deseja-se saber qual é a amostra preferida em detrimento de outra. A preferência é uma apreciação pessoal, geralmente influenciada pela cultura (religião, grupos raciais, nacionalidade, vivência familiar, perfil socioeconômico, entre outros), além da qualidade do produto avaliado. São necessários grupos grandes de avaliadores para se obter uma diferença estatisticamente significativa nos resultados, que represente com eficácia a população à qual o produto se destina (Moraes, 1988). Como exemplo de teste de preferência se apresenta a seguir a figura 12.

Figura 12 – Exemplo de teste de preferência.

TESTE PAREADO DE PREFERÊNCIA		
Nome:	sexo:	idade:
Data:	horário do teste:	
Estamos fazendo uma pesquisa sobre a preferência do consumidor para este produto. Prove as duas amostras e indique sua preferência: Prefiro a amostra: Dê a razão da sua preferência:		
Frequência do consumo do produto objeto do teste: () Tomo frequentemente () Tomo ocasionalmente () Nunca tomo		
Comentários:		

Fonte: Dutcosky, 1996.

2.4.1.2. Teste de escala hedônica

Nas provas hedônicas o provador indica a sua reação subjetiva sobre o produto, indicando se gosta ou não gosta do produto, se o aceita ou não, ou se o prefere a outro produto. Estas provas apresentam uma grande variabilidade e são as provas cujos resultados são mais difíceis de interpretar, já que tratam de opiniões completamente pessoais, como se costuma dizer “cada cabeça sua sentença” ou “gostos não se discutem” (Noronha, 2003).

Um marco histórico nesta classe de testes foi o desenvolvimento de uma escala nos EUA pelo U.S. Army and Food Container Institute no final de 1940, que proporcionou uma escala de nove pontos equilibrada, composta por categorias de gosto e desgosto, e de uma categoria neutra. Com estas categorias produziram rótulos de pontos de escala com advérbios que representavam intervalos psicologicamente iguais ou mudanças de níveis hedônicos (Lawless & Heymann, 2010). Tradicionalmente, as escalas heônicas compreendem a nove pontos ou palavras que traduzem outros tantos níveis de agrado e/ou desagrado (Esteves, 2009).

Na Tabela 7 está expressa a escala hedônica de nove pontos desenvolvida pelo U.S. Army and Food Container Institute, adaptada de Lawless & Heymann (2010), que ao longo dos anos alcançou uma ampla utilização em testes de consumo de alimentos.

Tabela 7 - Escala para avaliação hedônica.

Gostei extremamente
Gostei muito
Gostei moderadamente
Gostei ligeiramente
Não gostei nem desgostei
Desgostei ligeiramente
Desgostei moderadamente
Desgostei muito
Desgostei extremamente
Escala de nove pontos para representar intervalos psicológicos iguais.

Adaptado de: Lawless & Heymann (2010).

1.4.2. Condições necessárias para aplicação da análise sensorial

De acordo com Dutcosky (1996), os testes de análise sensorial na maioria dos casos devem realizar-se em locais tranquilos, onde o provador fique livre de distúrbios e seja capaz de se concentrar. O provador necessita saber o que deve ser percebido com o mínimo de interpretação subjetiva, de modo a que os resultados possam ser relacionados significativamente com as medições mecânicas e instrumentais e com as pesquisas de mercado. É necessário, portanto, criar condições especiais para que o provador avalie o produto o mais objetivamente possível.

A zona de preparação das amostras deve estar situada nas proximidades do local de ensaio. Esta zona deve ser bem ventilada, de modo a que seja possível eliminar rapidamente os odores estranhos e os resultantes da preparação das amostras (Noronha 2003).

O laboratório de análise sensorial deve ser um local inodoro, longe de barulhos e de fácil acesso. Deve possuir cabines individuais, cor branca ou neutra, boa iluminação e tamanho de acordo com a necessidade da demanda. Os recipientes devem ser brancos, limpos e inodoros. Idealmente o teste deve decorrer duas horas antes ou depois das refeições, deve-se oferecer água, pão ou bolachas de água e sal para fazer o branco entre as amostras. As provas das amostras devem ser efetuadas da esquerda para a direita, iniciando-se os testes primeiramente com a análise de odor (Dutcosky 1996, Moraes 1988, Noronha 2003).

Em relação às amostras deve-se definir e padronizar sua quantidade e temperatura. Noronha (2003) recomenda que sejam fornecidos pelo menos cerca de 15 a 20 ml, no caso de amostras líquidas, e que a temperatura se encontre entre os 60 e 66 °C para bebidas quentes e sopas. Deve também existir uniformidade entre as amostras e estarem codificadas (Dutcosky, 1996). A codificação da amostra deve ser feita de modo a não induzir a avaliação, sendo, por isso, desaconselhável o uso de numeração simples (exemplo: 1, 2, 3) ou por letras (exemplo: a, b, c), pois tal pode induzir a classificação da mostra "1" ou "a" como a melhor. Recomenda-se a utilização de um código com três dígitos aleatórios (por exemplo, 118, 274, 387) para cada amostra (Moraes, 1988). Para se definir o número de amostras devem considerar-se fatores como: natureza do produto, intensidade e complexidade da propriedade que está sendo analisada, tipo de teste aplicado e tempo disponível para a realização do teste (Dutcosky, 1996).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação da amostra

3.1.1. Materiais

Para desenvolvimento deste trabalho o chá preto (*Camellia sinensis*) utilizado foi o Chá Gorreana Pekoe da Fábrica de Chá Gorreana, S. Miguel – Açores (Figuras 13 a) e b)). Escolheu-se utilizar a água do Luso para a extração aquosa da folha de chá. Para a análise sensorial, utilizou-se a água mineral Floresta. As águas foram escolhidas por suas características desejáveis à preparação do chá (baixo teor em sais), e para garantir a reprodutibilidade das análises. Ambos os materiais foram comprados no comércio local em Lisboa, Portugal, com exceção da água mineral utilizada para a análise sensorial, que foi comprada no comércio de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.



a)



b)

Figura 13 – a) Chá preto da Gorreana Pekoe; b) Folhas de chá preto da Gorreana Pekoe.

3.2. Métodos

Os procedimentos de preparação das amostras para determinação da cafeína estão descritos em seguida.

3.2.1 Procedimento da primeira extração da folha

A definição do método de extração da folha foi baseado na descrição do modo de preparação da infusão de chá sugerido na embalagem do Chá Gorreana Pekoe. Considerando a relação massa de folha/volume de água, era referido uma colher de sopa de folha para 500 ml de água. Para garantir reprodutibilidade, pesou-se uma colher de sopa de folhas e, com base neste valor, calculou-se a quantidade necessária para preparar uma infusão em 50 ml de água. O valor usado foi assim aproximado a 330 mg de folhas de chá. O processo de extração aquosa ocorreu com água à temperatura de ebulição, que foi vertida em um copo já contendo a folha de chá. Quando a água entrava em contato com a folha apresentava uma temperatura em torno de 80 °C. Desta forma a temperatura de início de extração é de apenas 80 °C e a temperatura de fim de extração vai depender do tempo do processo. Foram preparados cinco chás com 1, 2, 3, 5 e 20 minutos de contato da folha com a água. As folhas de chá foram separadas da infusão através de um coador de metal.

Dos 50 ml de infusão de chá, 25 ml foram passados para um balão tarado e liofilizados. Os 25 ml restantes não foram utilizados, tendo sido descartados.

3.2.2. Procedimento da segunda extração da folha

Os procedimentos da segunda extração aquosa da folha de chá preto ocorreram da mesma forma que na primeira extração acima descrita, tendo-se utilizado as folhas previamente usadas na primeira extração. Logo após a primeira extração ocorreu a segunda extração aquosa da folha de chá. Os tempos das segundas extrações foram iguais aos da primeira extração para cada caso. Foram armazenadas as soluções em balões volumétricos, tapados e vedados, permanecendo em frigorífico até o momento de utilização.

Dos 50 ml de infusão de chá, 25 ml foram passados para um balão tarado e liofilizados. Os 25 ml restantes não foram utilizados, tendo sido descartados.

3.2.3. Liofilização

Como já referido, após a separação das folhas da infusão de chá, foram pipetados 25 ml da solução (infusão de chá) para um balão tarado. Esta solução foi congelada utilizando para este processo o nitrogênio líquido e levada ao liofilizador. As amostras permaneceram no

liofilizador por cerca de 24 horas, ou mais, até à total liofilização (Figura 14). Para o processo de liofilização das amostras utilizaram-se dois liofilizadores, um da marca Scanvac modelo CoolSafe e o outro da marca Edwards modelo Freeze dryer modulyo®.



Figura 14 – Liofilização das amostras.

3.2.4. Procedimento de extração com clorofórmio

A cafeína foi extraída do material liofilizado com clorofórmio (3 x 10 ml) à temperatura ambiente. Para cada amostra, ao resíduo totalmente liofilizado foram adicionados 10 ml de clorofórmio comercial, agitou-se por 30 segundos e levou-se a banho de ultrassons durante 10 minutos (Figura 15). O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico. Repetiu-se o procedimento mais duas vezes com 10 ml de clorofórmio em cada uma delas. O volume total de clorofórmio foi transferido para um balão e evaporado em um evaporador rotativo. Os balões com o resíduo evaporado foram lavados com 1,5 ml de clorofórmio, e a mistura filtrada por centrifugação em eppendorfs. A centrifugação ocorreu em uma centrífuga Multi-spin 3000. O conteúdo resultante da filtração foi transferido dos eppendorfs para pequenos frascos, novamente evaporado o solvente em evaporador rotativo, e armazenado no frigorífico para posterior análise.



Figura 15 – Extração com clorofórmio das amostras liofilizadas.

3.3. Análise Cromatográfica

As amostras (extratos obtidos pelo processo acima descrito) foram pesadas e ressuspensas para realização da análise por GC. A ressuspensão ocorreu em 500 μL de clorofórmio. Dessa quantia 400 μL foram armazenados, para o caso de haver necessidade de realizar novas análises, e aos 100 μL restantes foi adicionado o padrão interno. A cada amostra foi adicionado 100 μL de padrão interno (PI), lupanina a 100 ppm, por este ser um alcalóide que não se encontra presente nos extratos, e possui um tempo de retenção diferente dos componentes das amostras.

Para otimização do processo analítico foram realizadas análises cromatográficas prévias de algumas amostras selecionadas. Este procedimento permitiu, otimizar toda a separação cromatográfica no menor tempo possível de análise, assim como avaliar a ordem de grandeza dos teores de cafeína das várias amostras em estudo (1^a e 2^a extração e tempos de infusão de 1, 2, 3, 5 e 20 minutos). Desta forma foi possível determinar o intervalo de concentrações das curvas de calibração do método analítico, recorrendo ao uso de soluções padrão de cafeína com concentrações conhecidas (50 e 200 ppm) e por comparação das áreas obtidas com as das amostras estipularam-se os limites máximos e mínimos para as curvas de calibração.

Com o objetivo referido e um conjunto completo de todas as amostras preparadas, deu-se início às análises por GC. Foram injetados 1 μL de cada amostra, iniciando pelas amostras da primeira extração, e seguindo-se as da segunda extração, realizando todas as análises por ordem crescente de tempo de extração e em triplicado.

As amostras foram analisadas por GC-FID (Gas Chromatography – Flame Ionization Detector), num cromatógrafo da marca Konik, modelo Konik HRGC 4000B (Figura 16).



Figura 16 – Cromatógrafo da marca Konik, modelo Konik HRGC 4000B.

3.3.1. Calibração

Através da análise de amostras selecionadas (ver Tabelas 8 e 9), realizadas por GC-FID, foram desenvolvidas duas curvas de calibração, uma para doseamento das amostras da 1ª extração e outra para as da 2ª extração, como referido anteriormente (subcapítulo 3.3. Análise Cromatográfica). Cada curva de calibração foi traçada através da relação entre a razão das áreas de cafeína e lupanina e a razão entre as respectivas concentrações. Para elaboração das curvas de calibração prepararam-se soluções padrão com diferentes concentrações de cafeína e adição de padrão interno. Injetou-se 1 μL de solução padrão por ordem crescente de concentração no cromatógrafo, iniciando pela curva de calibração referente à 1ª extração.

Para a 1ª extração, desenvolveu-se uma curva de calibração de cinco pontos, iniciou-se com uma solução com 25 ppm de cafeína e os pontos seguintes foram definidos com uma variação da concentração de cafeína de 25 ppm entre os dois primeiros pontos e 50 ppm entre os pontos seguintes, como mostra a Tabela 8. A concentração de PI (lupanina) foi de 101,3 ppm.

Para a 2ª extração, traçou-se uma curva de calibração com sete pontos. Conforme apresentado na Tabela 10, iniciou-se com uma solução com 6,09 ppm de cafeína e os pontos seguintes foram definidos com uma variação das concentrações de cafeína de 4 ppm entre os dois primeiros pontos, 10 ppm entre o segundo e o terceiro pontos e 20 ppm entre os demais pontos da curva. A concentração de PI (lupanina) foi de 30,15 ppm.

Cada solução padrão de ambas as curvas foi analisada em triplicado. Os resultados expressos nas Tabelas 8 e 9 são calculados pela média entre os valores concordantes de cada série.

Tabela 8 - Dados para elaboração da curva de calibração para doseamento das amostras de 1ª extração de cafeína.

	Cafeína		PI (Lupanina)		Conc.Cafeína / Conc PI	Área Cafeína / Área PI
	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área		
p0,5	25	0,599	101,3	11,267	0,247	0,053
p0,5	25	0,736	101,3	20,396	0,247	0,036
p1	50	2,227	101,3	11,790	0,494	0,189
p2	100	7,376	101,3	17,281	0,987	0,427
p3	150	13,034	101,3	18,655	1,481	0,699
p4	200	14,51	101,3	14,821	1,974	0,979

Figura 17 – Curva de calibração referente à 1ª extração da folha.

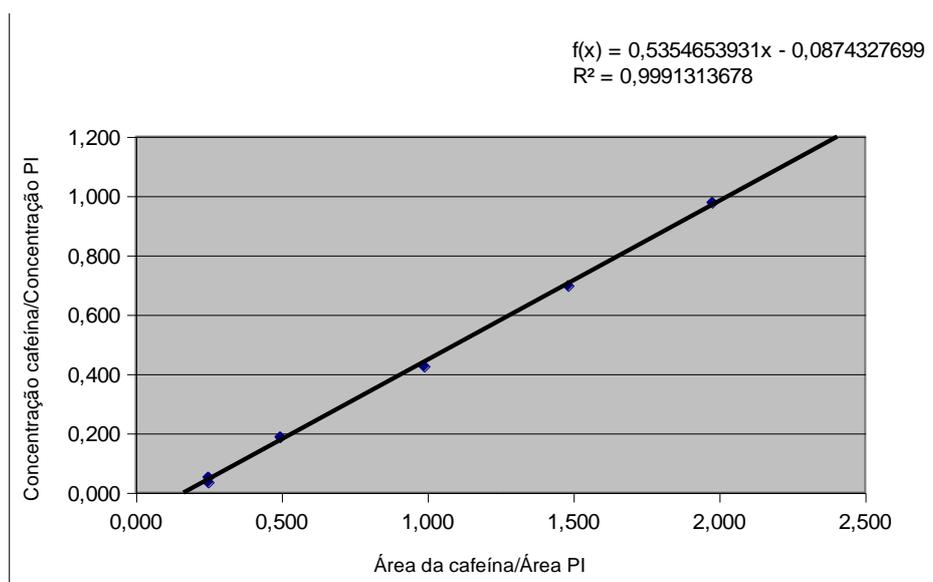
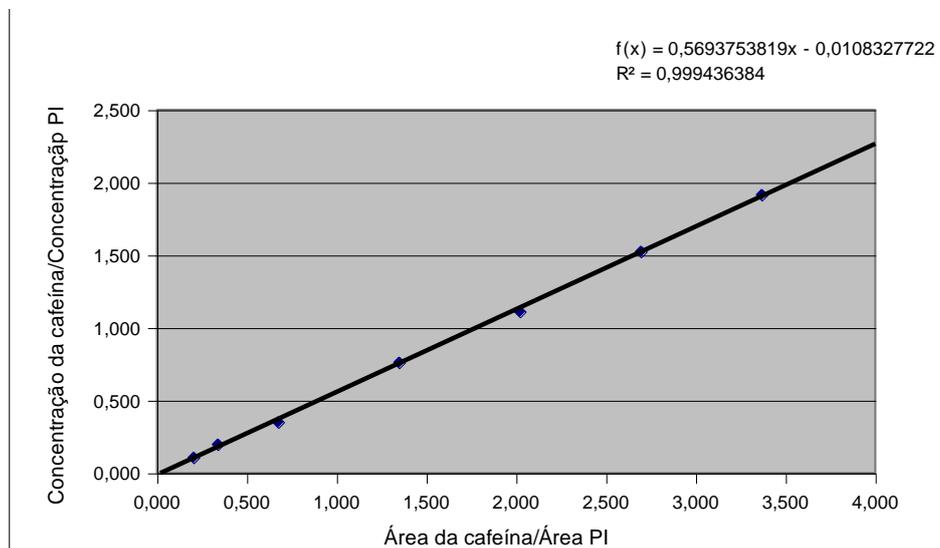


Tabela 9 - Dados para elaboração da curva de calibração para doseamento das amostras de 2ª extração de cafeína.

	Cafeína		PI (Lupanina)		Cafeína / PI	
	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc.Cafeína / Conc PI	Área Cafeína / Área PI
P1	6,09	4,829	30,15	44,417	0,202	0,109
P2	10,15	5,114	30,15	25,610	0,337	0,200
P3	20,3	8,277	30,15	23,465	0,673	0,353
P4	40,59	18,931	30,15	24,823	1,346	0,763
P5	60,89	32,818	30,15	29,481	2,020	1,113
P6	81,18	33,075	30,15	21,672	2,693	1,526
P7	101,48	43,326	30,15	22,601	3,366	1,917

Figura 18 – Curva de calibração referente à 2ª extração da folha.



3.3.2. Condições cromatográficas (1ª e 2ª extração da folha)

Para análise das amostras através da cromatografia gasosa, utilizaram-se as mesmas condições cromatográficas para as duas gamas de amostras (1ª e 2ª extração), e também para as curvas de calibração, alterando-se apenas a razão de split entre elas. Para cada amostra foram efetuadas três injeções.

Características da Coluna: DB5, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film. Temperatura do Injetor: 250 °C, temperatura do detector: 250 °C.

Programa de temperatura: 120 °C por 0 minutos, 15 °C/minutos até 250 °C, temperatura que se mantém durante 2 minutos, 4 °C/minutos até 235 °C, 20 °C/minutos até 300 °C temperatura que se mantém durante 10 minutos. Fluxo He: 1 µL/min. Quantidade injetada: 1 µL.

Razão de split para as amostras da 1ª extração: 1:30; Razão de split para as amostras da 2ª extração: 1:5.

Os resultados finais da quantificação de cafeína presente nas amostras referentes à 1ª e 2ª extração da folha de chá estão apresentados para melhor visualização dos dados na tabela a seguir (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados finais da quantificação de cafeína presente nas amostras referentes à 1ª e 2ª extração da folha de chá.

Amostra *	Peso de Folha (g)	Conc. Cafeína (ppm)	Conc. média (ppm)	mg caf./3 g de folha
1.1 1ªE	0,3338	140,75	144,46	2,60
1.3 1ªE	0,3333	148,17		
3.2 1ªE	0,3332	160,97	166,07	2,98
3.3 1ªE	0,3335	171,18		
5.2 1ªE	0,3342	170,98	174,62	3,14
5.3 1ªE	0,3327	178,26		
20.2 1ªE	0,3346	2877,00	3024,72	54,32
20.3 1ªE	0,3336	3172,45		
1.2 2ªE	0,3343	27,82	28,81	0,52
1.3 2ªE	0,3333	29,80		
3.1 2ªE	0,3335	5,33		
3.2 2ªE	0,3332	6,59	5,96	0,10
5.1 2ªE	0,3338	7,34	8,17	0,14
5.2 2ªE	0,3342	9,00		
20.2 2ªE	0,3346	11,60	10,91	0,20
20.3 2ªE	0,3336	10,22		

* Código da amostra, sendo o primeiro número referente ao tempo de infusão, e o segundo da amostra realizada sequencialmente, seguido do número da extração realizada.

3.4. Análise sensorial do chá preto

3.4.1. Elaboração das amostras para análise sensorial

O processo de elaboração do chá para análise sensorial, descrito a seguir, ocorreu de forma idêntica ao que tinha sido feito para análise da cafeína. Utilizou-se chá preto Pekoe da Fábrica de Chá Gorreana, S. Miguel – Açores.

A definição do método de extração da folha foi baseada na descrição do modo de preparação da infusão de chá sugerido na embalagem do Chá Gorreana Pekoe. A relação massa de folha/volume de água referida é de uma colher de sopa de folha, 3,30 g, para 500 ml de água. O processo de extração aquosa ocorreu vertendo a água à temperatura de ebulição, sendo elaborado quatro chás com 1, 3, 5 e 20 minutos de tempo de infusão e diferentes extrações das mesmas folhas de chá (1ª e 2ª extração), preparando-se 1,5 litros de cada infusão de chá de uma única vez. Os procedimentos da segunda extração aquosa da folha de chá preto são idênticos aos da primeira extração, ocorrendo logo após esta. As amostras apresentadas para Análise Sensorial apresentavam 25 ml de infusão de chá e foram servidas a uma temperatura em torno de 65° C, de acordo com o recomendado por Noronha (2003).

Os chás foram elaborados em uma das cozinhas do Laboratório do Curso de Gastronomia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), no entanto as análises sensoriais ocorreram em uma sala ao lado.

3.4.2. Análise sensorial

O processo de análise sensorial ocorreu após um esclarecimento sobre os objetivos do presente estudo, e após a concordância dos participantes, tendo sido solicitada a assinatura do participante no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE que foi apresentado aos participantes está em anexo (Anexo I).

A análise sensorial do chá preto foi efetuada através de um teste de escala hedônica e um teste de preferência. Incluiu-se no final da ficha uma pergunta sobre a frequência do consumo do produto avaliado. Utilizou-se para classificação uma escala hedônica de nove pontos que variou de 1 para desgostei muitíssimo a 9 para gostei muitíssimo, onde se avaliaram aspectos como odor, cor, adstringência, amargor e doçura (Dutcosky, 1996 Lawless & Heymann 2010). As condições em que se aplicou a análise sensorial ocorreram de acordo com os aspectos necessários descritos anteriormente (Subcapítulo 2.4.2).

As análises sensoriais ocorreram em dois dias consecutivos, com alunos dos cursos de Gastronomia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). As análises ocorreram com 25 provadores em cada dia de avaliação, no primeiro dia foram avaliadas as amostras 1.1, 1.2, 3.1, 3.2 e no segundo dia as amostras 5.1, 5.2, 20.1, 20.2, todas as amostras foram analisadas em repetição. Os provadores foram recepcionados em uma das salas do curso de Gastronomia da Universidade Federal de

Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), onde se procederam as análises. Foram recebidos dois provadores por vez, e a cada um deles apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) juntamente com a ficha de análise sensorial, as amostras e um copo de água. Recorreu-se a um painel de 50 provadores não treinados no total, entre as duas sessões de provas, para a avaliação das infusões de chá, através de uma folha de prova desenvolvida tendo por base a apreciação global dos produtos (Anexo II).

3.4.3. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos resultados deste estudo, as respostas obtidas através da análise sensorial para os atributos de cor, aroma, sabor e odor foram submetidas a uma análise de variância (*one-way* ANOVA), sendo realizados testes de comparação múltipla de Tukey, a um nível de significância de 95%. Recorreu-se ao uso do teste de Tukey, pois ele permite testar qualquer contraste, sempre, entre duas médias de tratamentos, baseando-se na Diferença Mínima Significativa (DMS) (ANJOS, 2009). Todos os tratamentos estatísticos deste estudo foram realizados com recurso ao *software* SPSS Statistics (v.20, IBM SPSS Statistics, New York, EUA).

3.4.4. Considerações éticas

O presente estudo foi submetido para avaliação, através de um projeto de pesquisa, que se encontra em anexo (Anexo V) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (CEP - UFCSPA). Este estudo atende às determinações da Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde.

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos processos

4.1.1. Otimização do método de extração

A técnica usada para a quantificação da cafeína, desde a extração da folha até ao método analítico, teve como fatores norteadores a mimetização do processo de preparação de um chá pelo consumidor e a realização de uma metodologia que implicasse um menor tempo de elaboração e menor manuseio das amostras.

Neste estudo realizou-se primeiramente o processo da extração aquosa da folha de chá preto (Chá Gorreana Pekoe dos Açores), procedendo como descrito anteriormente (subcapítulo 3.2.2).

Na literatura foram descritos vários processos de extração da cafeína a partir de folhas de chá e infusões de folhas de chá (Groisser, 1978, Lin *et al.* 2003, Srivas & Wu, 2007, Komes *et al.* 2009, Horžic' *et al.* 2009). No entanto, o processo de extração da cafeína usado neste trabalho, que envolve a liofilização das infusões, não estava descrito antes. A metodologia seguida foi elaborada com base nas metodologias já existentes acima referidas, e foi desenvolvida a fim de obter um processo de extração o mais simples possível. Também se optou por minimizar a utilização de reagentes nocivos à saúde humana e ao meio-ambiente, ao contrário das metodologias desenvolvidas por Komes *et al.* (2009), que propôs um método utilizando acetato de chumbo, e por Groisser (1978), que utilizou benzeno.

Segundo Srivas & Wu, (2007) o clorofórmio é o solvente mais adequado para extrair a cafeína de uma solução aquosa. Este fato deve-se à elevada solubilidade da cafeína em clorofórmio que é cerca de oito vezes superior à solubilidade em água à temperatura ambiente, pelo que possui uma elevada capacidade de dissolução sendo o solvente mais eficaz em concentração de cafeína para análise (Sereshti & Samadi, 2014). Maidon *et al.* (2012) fizeram

um estudo comparativo de solubilidade de cafeína em quatro solventes para a sua extração a partir de folhas de chá, dentre eles metanol, clorofórmio, água e acetato de etilo. O clorofórmio foi o melhor solvente dos quatro estudados. No caso deste trabalho a extração inicial foi realizada com água, pois o objetivo era comparar o teor de cafeína em infusões de folhas de chá. Dado se ter desenvolvido uma técnica que envolve a liofilização para fazer a extração da cafeína das infusões, não foi necessário extraí-la diretamente da solução aquosa. No entanto, a elevada solubilidade da cafeína em clorofórmio, e o fato deste ser um solvente comum utilizado na preparação de amostras para doseamento de cafeína, levou a que fosse escolhido para extrair a cafeína do material liofilizado.

A cafeína foi extraída do material liofilizado com clorofórmio como descrito anteriormente (subcapítulo 3.2.4). Para a injeção no cromatógrafo foi necessário separar algumas partículas dispersas. Para tal as amostras, ressuspensas em 1,5 ml de clorofórmio, foram transferidas sucessivamente em porções de 100 µl para eppendorfs para posterior centrifugação. As filtrações sucessivas foram necessárias, devido à dimensão reduzida do material e da centrífuga utilizados. O conteúdo total de cada amostra foi depositado em um frasco e novamente evaporado e armazenado, para posterior análise.

Na metodologia desenvolvida neste trabalho a principal diferença está no processo de extração da cafeína da fase aquosa. Para evitar o processo de extração líquido/líquido da cafeína a partir da fase aquosa para o clorofórmio, um processo muito moroso devido às emulsões que se formam, optou-se pela liofilização das amostras de chá. Esta técnica apresenta ainda a vantagem de poder decorrer durante a noite. O procedimento demonstrou grande eficiência.

4.1.2. Otimização do processo cromatográfico

Relativamente à metodologia, o objetivo neste trabalho foi o de desenvolver uma técnica simples, que necessite de pequenos volumes de amostras e solventes, permitindo determinações rápidas e que possua alta reprodutibilidade. Foi desenvolvido o procedimento descrito baseado na extração do material liofilizado e para a quantificação recorreu-se à cromatografia gasosa com detector ionização de chama (GC-FID). O método de quantificação por meio da cromatografia gasosa foi o escolhido por permitir uma fácil detecção e análise da cafeína. Segundo Strahl *et al.* (1977), em volumes pequenos de amostras de cafés e chás tem várias vantagens relativamente a outros métodos, havendo boa especificidade e sensibilidade do método cromatográfico mesmo para a determinação de níveis baixos de cafeína.

No método cromatográfico desenvolvido medem-se as áreas cromatográficas que correspondem às quantidades de analitos nas amostras analisadas. Para quantificação dos analitos traçam-se previamente curvas de calibração com utilização de padrão interno (PI). A quantificação com base em curva de calibração é um método que envolve a preparação de uma série de soluções padrão de composições próximas à concentração do analito na

amostra. Os cromatogramas dos padrões são então obtidos, e a relação das alturas ou das áreas dos picos dos analitos e padrão interno, em função da concentração permitem obter um gráfico. Idealmente a curva deve ser uma reta que passa pela origem e a concentração da amostra é obtida a partir da equação desta reta (Collins *et al.* 1997).

As amostras da primeira extração apresentaram um teor significativamente mais alto em cafeína quando comparadas com as amostras da segunda extração, devido às diferenças de concentrações da cafeína nas infusões obtidas da primeira e segunda extração das folhas. Observou-se assim a necessidade da elaboração de duas curvas de calibração distintas seguindo o método descrito (subcapítulo 3.3 e 3.3.1). A partir dessas análises prévias testaram-se diversas rampas de temperatura e diferentes razões de *split*, para assim desenvolver as melhores condições cromatográficas. Com isso traçou-se uma curva de calibração com cinco pontos (Figura 17), para quantificar a cafeína nas amostras da primeira extração. Injetou-se 1 µL de cada amostra com uma razão de *split* de 1:30 no injetor. A curva de calibração apresenta um coeficiente de correlação de 0,999. Para as amostras da segunda extração, traçou-se uma curva com sete pontos (Figura 18), injetou-se 1 µL de cada amostra com uma razão de *split* 1:5 no injetor. Esta última curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação de 0,994.

Devido ao fato das amostras referentes a 2ª extração da folha estarem em menores concentrações, foi preferido elaborar uma curva de calibração com mais pontos para diminuir o erro associado à determinação da cafeína.

Figura 17– Curva de calibração para o doseamento de cafeína – 1ª extração da folha de chá preto.

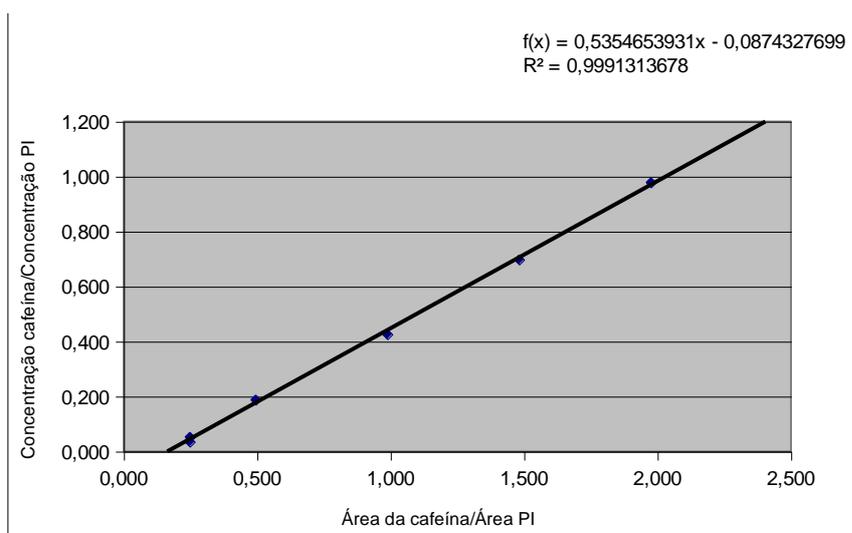
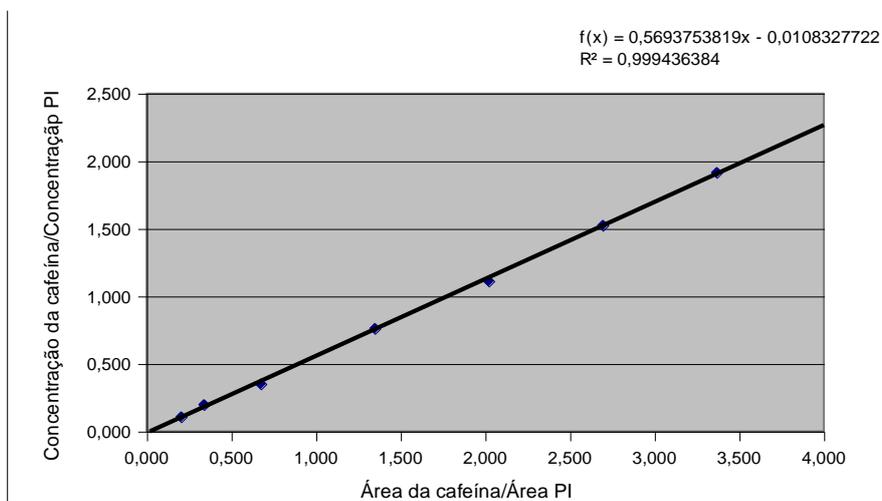


Figura 18 - Curva de calibração para o doseamento de cafeína – 2ª extração da folha de chá preto.



A substância utilizada como padrão interno foi a lupanina que havia sido extraída previamente das sementes de tremçoço (*Lipinus albus*) e que estava disponível no laboratório. Testes prévios demonstraram que a lupanina era um alcalóide adequado para PI na quantificação a realizar. Nos cromatogramas traçados verificou-se que o tempo de retenção da lupanina foi de 11,5 minutos, havendo um bom intervalo relativamente do tempo de retenção da cafeína, que foi de 6,5 minutos. Para melhor ilustrar a Figura 19 contém um cromatograma de uma amostra padrão, onde se pode observar este aspecto. Outro fator que permitiu à lupanina ser uma boa escolha como PI, foi o fato da sua área de pico ser bem delimitada e de fácil quantificação.

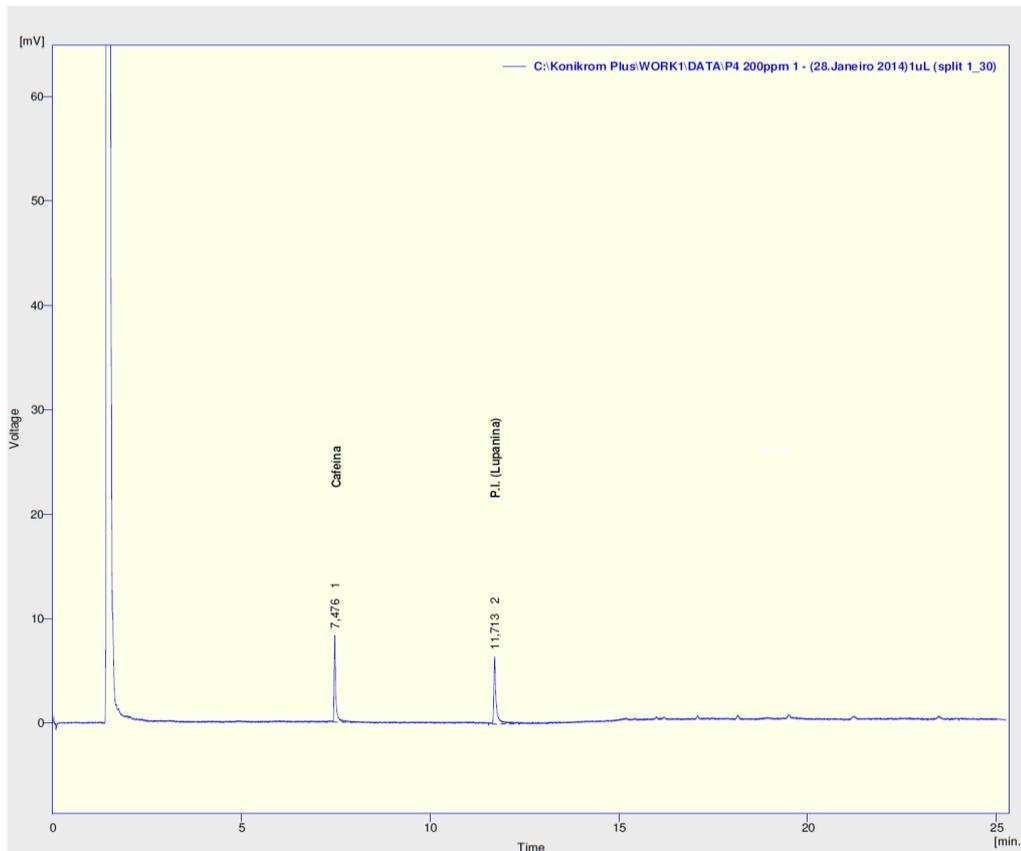


Figura 19 – Cromatograma de uma amostra padrão para ilustração dos tempos de retenção da cafeína e lupanina.

O padrão interno foi adicionado aos padrões e às amostras numa concentração final de 100 ppm, para a determinação da cafeína nas amostras da primeira extração, e de 20 ppm nas amostras da segunda extração, de forma a ficar enquadrado no centro da respectiva curva de calibração.

4.2. Quantificação da cafeína nas infusões de chá resultantes da 1ª e 2ª extração da folha de chá

Ao se realizar as primeiras análises quantitativas obtiveram-se oscilações inexplicáveis na quantidade de cafeína das amostras correspondentes a cada um dos diversos tempos de extração, indicando perda de cafeína em alguma etapa do processo. Através de testes desenvolvidos, concluiu-se que as oscilações eram devidas a perdas aleatórias nas centrifugações por excesso de volume de solução usada nos eppendorfs. As amostras com um

volume total de 1,5 ml de solução eram inicialmente divididas por três eppendorfs para filtração, ficando cada um com 500 µL. Ao identificar a razão da inconsistência dos resultados, alterou-se o processo transferindo para cada eppendorf a quantidade para 100 µL, reduzindo-se assim a perda apesar de se aumentar para cinco as etapas de filtração de cada amostra.

Após o desenvolvimento do novo processo de filtração e a verificação que a perda existente anteriormente tinha sido ultrapassada, as segundas análises foram realizadas da mesma forma. Considerou-se como resultados coerentes os resultados das amostras que apresentavam no mínimo dois dos três resultados das análises concordantes. De acordo com este critério, as amostras de 2 minutos de ambas as extrações foram desprezadas. Estas amostras foram realizadas em triplicado e não apresentaram resultados concordantes. Para excluir qualquer possível erro de injeção as amostras referentes ao tempo de 2 minutos foram injetadas por uma segunda vez, verificando-se que os resultados ainda assim não estavam concordantes.

4.2.1. Doseamento da cafeína

Os cálculos dos valores expostos nas Tabelas 11 e 12 foram feitos com base nos resultados das análises cromatográficas. Como exemplo encontram-se apresentados em anexo dois cromatogramas, um contendo uma amostra de cada tempo de infusão da 1ª extração da folha de chá e o outro contendo uma amostra de cada tempo de infusão para a 2ª extração da folha de chá (Anexo III).

Nelas estão apresentados os valores de cafeína calculados em mg/3 g de folha, em percentagem relativamente ao peso da folha (portanto % de cafeína que foi extraída relativamente à massa total da folha usada), e em ppm (referente à concentração de cafeína presente na solução com clorofórmio). Apresentam-se os valores em mg de cafeína/3 g de folha pois é esta a massa aproximada que é usada para preparar 500 ml de chá segundo a indicação da embalagem. Este volume corresponde em média a duas canecas de chá.

Os valores apresentados nas Tabelas 11 e 12 são relativos as soluções injetadas no cromatógrafo, sendo os resultados de acordo com o resultado cromatográfico para 1ª e 2ª extração da folha.

Tabela 11 – Doseamento da cafeína presente nas amostras referentes à 1ª extração da folha de chá.

Amostra *	Peso de Folha (g)	Conc. Cafeína (ppm)	Conc. média (ppm)	mg caf / 3 g de folha	% de cafeína (w/w)
1.1 1ªE	0,3338	140,752	144,46	2,60	0,086
1.3 1ªE	0,3333	148,173			
3.2 1ªE	0,3332	160,967	166,07	2,98	0,100
3.3 1ªE	0,3335	171,182			
5.2 1ªE	0,3342	170,975	174,62	3,14	0,104
5.3 1ªE	0,3327	178,258			
20.2 1ªE	0,3346	2876,998	3024,72	54,32	1,810
20.3 1ªE	0,3336	3172,451			

* Código da amostra, sendo o primeiro número referente ao tempo de infusão, e o segundo da amostra realizada sequencialmente, seguido do número da extração realizada.

Tabela 12 – Doseamento da cafeína presente nas amostras referentes à 2ª extração da folha de chá.

Amostra*	Peso de Folha (g)	Conc. Cafeína (ppm)	Conc. média (ppm)	mg caf / 3 g de folha	% de cafeína (w/w)
1.2 2ªE	0,3343	27,82	28,81	0,52	0,018
1.3 2ªE	0,3333	29,80			
3.1 2ªE	0,3335	5,33	5,96	0,10	0,004
3.2 2ªE	0,3332	6,59			
5.1 2ªE	0,3338	7,34	8,17	0,14	0,004
5.2 2ªE	0,3342	9,00			
20.2 2ªE	0,3346	11,595	10,909	0,20	0,006
20.3 2ªE	0,3336	10,223			

* Código da amostra, sendo o primeiro número referente ao tempo de infusão, e o segundo da amostra realizada sequencialmente, seguido do número da extração realizada.

Tanto para a 1ª como para a 2ª extração da folha verifica-se que os teores em cafeína no chá ao fim de 1, 3 e 5 minutos de extração são da mesma ordem de grandeza, sendo mesmo muito próximos (variação entre 0,086 e 0,104% para a 1ª extração e 0,018 e 0,004 para a 2ª) (Tabela 13). Os valores ligeiramente crescentes na 1ª extração são de esperar e os valores decrescentes para a 2ª extração explicam-se pelo fato de já ter existido uma extração anterior e desta forma a variação ser de progressão inversa.

Tabela 13 - Quantificação de cafeína na 1ª e 2ª extração (ext.) da folha de chá a diferentes tempos de extração da folha em concentração (Conc.) em mg de cafeína/3 g de folha e em percentagem.

Tempo (min)	Conc. mg cafeína / 3g 1ª ext	Conc. mg cafeína / 3g 2ª ext	% de cafeína (w/w) 1ª ext	% de cafeína (w/w) 2ª ext
1	2,60	0,52	0,086	0,018
3	2,98	0,10	0,100	0,004
5	3,14	0,14	0,104	0,004
20	54,32	0,20	1,810	0,006

Analisando os valores em percentagem pode fazer-se uma comparação com os resultados publicados por outros autores.

O teor de cafeína publicado por Komes *et al.* (2009), corresponde a um conteúdo de cafeína no chá preto de 0,69%. Este valor foi obtido de 20 g de folhas para 90 ml de água aquecidos a refluxo por 30 minutos. Foi efetuada uma filtração e as folhas sujeitas a um segundo refluxo. Esta infusão foi então extraída com clorofórmio e a quantidade determinada com base no resíduo da evaporação. O método usado foi diferente do realizado neste trabalho e, como é evidente dos resultados obtidos por estes autores com vários métodos de extração é muito superior, há que ter em conta que o procedimento de extração usado tem grande influência nos resultados obtidos. No caso do presente trabalho era de esperar um resultado inferior, visto que o tempo e a temperatura de infusão foram bastante inferiores. Segundo o método descrito acima encontramos valores cerca de sete vezes e meia a seis vezes inferiores para os tempos de extração de 1 e 5 minutos, respectivamente. Por outro lado o teor que foi determinado neste trabalho para o tempo de 20 minutos de extração quase que triplica o publicado por Komes *et al.* (2009). A influência do tempo de infusão (5, 15 e 30 minutos) sobre a quantidade de cafeína liberada foi descrito por El-Shahawi *et al.* (2012). Seus resultados indicaram que, ao aumentar o tempo de infusão de folhas de chá verde de 5 para 30 minutos aumentou o conteúdo médio de cafeína respectivamente de 1,93 mg/g para 2,59 mg/g de folhas de chá verde secas. Este aumento indica que a taxa de liberação de cafeína aumentou quando houve uma elevação considerável do tempo de infusão, no entanto numa proporção inferior à observada neste trabalho.

O valor determinado para 20 minutos neste estudo é elevado e significativamente superior ao obtido por Komes *et al.* (2009) na extração com clorofórmio, porém inferior quando comparados com resultados obtidos por outros métodos em que Komes *et al.* (2009) utilizaram um extrato aquoso preparado com 2,5 g de folhas de chá a que foram adicionados 200 ml de

água em ebulição e agitados durante 10 minutos. Nesse estudo o teor de cafeína na infusão de chá quantificado através da análise por HPLC foi de 2,94%, e pelo micrométodo, que envolve extração com benzeno e ácido sulfúrico, e doseamento por espectroscopia na zona do UV, foi de 3,86% de cafeína.

Há ainda que ter especial cuidado ao comparar os teores de cafeína determinados a partir de infusões preparadas a partir de volumes diferentes de água relativamente à massa de folha. A capacidade de dissolução da cafeína na água terá um limite o que influenciará mais significativamente a quantidade extraída quando o volume de água é baixo.

No caso do valor obtido na primeira extração com um tempo de extração de 20 minutos, os resultados foram consistentes nas várias réplicas realizadas. Consideramos importante no futuro analisar este aspeto com mais detalhe. Os valores obtidos até aos 5 minutos levariam a prever que o valor para a extração de 20 minutos fosse da mesma ordem de grandeza, como aconteceu no trabalho de El-Shahawi *et al.* (2012). De fato a diminuição da temperatura da água ao longo do tempo, associada à grande variação da solubilidade da cafeína com a temperatura levaria a prever um resultado desta natureza. São necessários estudos posteriores para confirmar a validade dos valores obtidos para os 20 minutos. Caso se confirme, uma possível justificação para o aumento significativo da extração da cafeína poderá ser a maior hidratação das folhas e degradação da estrutura celular ao longo do tempo, que permite uma extração mais eficiente.

Hicks *et al.* (1996) encontraram resultados concordantes com os nossos, pois em suas análises as concentrações de cafeína em diversos tipos de chá diminuíram em extrações sucessivas. As percentagens extraídas em cada infusão sucessiva, relativamente ao teor total de cafeína extraído da infusão de chá preto, variaram de $60,6 \pm 5,25\%$ na primeira extração, $27,3 \pm 3,80\%$ na segunda extração e $12,2 \pm 1,77\%$ na terceira extração. As três extrações foram realizadas consecutivamente com um tempo de infusão de 5 min. A metodologia estabelecida por Hicks *et al.* (1996) difere da metodologia que utilizamos, onde as análises ocorreram diretamente com as infusões de chá pelo método de HPLC. Porém o que observamos em ambos os casos é concordante. Em ambos os trabalhos o objetivo principal foi verificar a variação do teor de cafeína entre as diferentes extrações aquosas da mesma folha de chá e em ambos se verifica uma diminuição significativa do teor de cafeína entre extrações.

Com as diferenças entre os valores obtidos para o teor de cafeína em infusões resultantes da 1ª e da 2ª extração, e os resultados de estudos já publicados, percebe-se que o que interfere de forma mais significativa no teor de cafeína na infusão de chá não é o tempo da infusão, mas sim a realização de diferentes extrações da mesma folha de chá. Wu *et al.* (2012) utilizaram uma metodologia semelhante à utilizada neste estudo. A metodologia seguida envolvia a extração de cafeína de folhas secas de chá com água a 96 °C durante 10 minutos, e extração de cafeína a partir da solução aquosa, utilizando clorofórmio. Analisaram as percentagens de extração entre quatro infusões sucessivas da mesma folha de chá. Como resultado obtiveram as percentagens cumulativas de extração da cafeína total existente,

extraindo de cerca de 66% na 1ª extração, 87% na 2ª extração, quase 100% para a 3ª extração e para 4ª extração não obtiveram uma variação detectável.

Aqui pode dizer-se que com os trabalhos de Wu (2012), El-Shahawi *et al.* (2012) e Hicks *et al.* (1996), se conclui que com extrações sucessivas da mesma folha se vai sucessivamente esgotando a cafeína existente até à extração total. E também que as quantidades extraídas de cafeína possuem variação progressiva conforme o tempo de infusão, mas não de variação excessiva entre os tempos de infusão.

Em resumo, dos resultados apresentados na Tabela 13, pode concluir-se que a quantidade de cafeína na 1ª extração aumentou com o tempo de infusão, mas (considerando os resultados das extrações com 1 – 5 minutos) que a maior parte foi extraída no 1º minuto. De fato apenas 17,0% do extraído ao fim de 5 minutos corresponde a cafeína não extraída no primeiro minuto. No caso dos 3 minutos, este valor é de 12,8%. Por esta razão quando ocorreu a 2ª extração das mesmas folhas de chá, com os mesmos tempos de extração (1, 3 e 5 minutos) a quantidade de cafeína extraída das amostras decresceu significativamente (5 vezes menor no caso de 1 minutos de extração e 22,5 vezes menos no caso de 5 minutos de extração). Este fato demonstra que a maior parte da cafeína presente na folha de chá nestas amostras foi extraída durante a 1ª extração.

Os resultados obtidos estão de acordo com os de Hicks *et al.* (1996), que obtiveram como uma das conclusões do seu estudo que as diferenças das concentrações de metilxantinas em infusões de chá, estando entre elas a cafeína, dependem do método de preparação utilizado.

Não é objetivo de o trabalho realizado determinar o teor total em cafeína nas infusões de chá, mas sim fazer a comparação entre os valores registrados em infusões realizadas com diferentes tempos de extração e em duas infusões sucessivas, em que a primeira foi realizada com o mesmo tempo de extração da segunda. Um dos objetivos deste trabalho era o de traduzir as conclusões em instruções úteis para o consumidor de forma a poder controlar o teor de cafeína ingerido. De fato temos verificado que muitos dos consumidores, se pretendem chá com menor teor de cafeína, o deixa em infusão durante pouco tempo, tendo tendência a associar o teor de cafeína à cor do chá obtido (mais ou menos escuro). Este estudo demonstra assim, de forma fundamentada, que este não é o caso. Obter um chá com baixo teor de cafeína depende, sobretudo, da realização de uma segunda extração, ou mesmo mais extrações aquosas da folha de chá, ao invés da elaboração de um chá com pouco tempo de infusão.

4.3. Resultados da análise sensorial

Os testes de análise sensorial tiveram lugar em uma sala da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, onde havia duas mesas de prova. Os provadores

realizaram os testes dois de cada vez, ocupando cada um deles uma das mesas. Os provadores receberam primeiramente o TCLE (Anexo I) para leitura e assinatura, a ficha de prova (Anexo II) e quatro amostras devidamente codificadas, como consta nas Figuras 20 e 21. Para melhor confiança dos resultados, as amostras foram analisadas em repetição, possuindo códigos diferentes para não haver influência entre as análises.

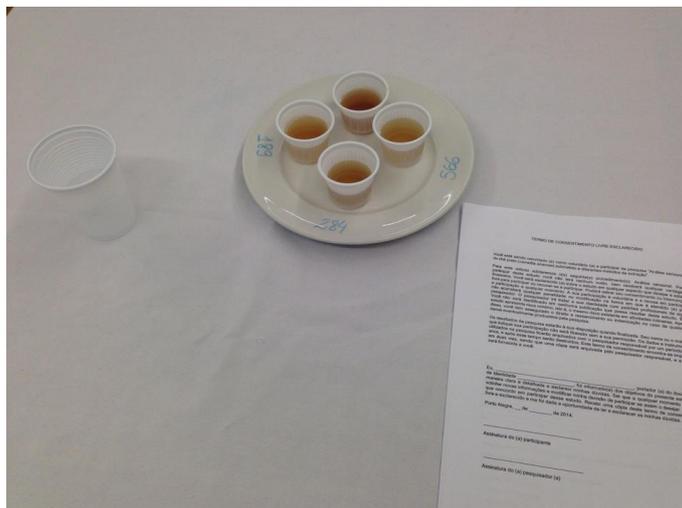


Figura 20 – Mesa apresentada aos provadores para realização da análise sensorial (1º dia).



Figura 21 – Mesa apresentada aos provadores para realização da análise sensorial (2º dia).

Os participantes nos testes de análise sensorial tinham uma média de idades de 27 anos. As análises ocorreram em dois dias, no primeiro dia analisaram-se as amostras 1.1, 1.2,

3.1 e 3.2, estas amostras são apresentadas na Figura 22. Durante o segundo dia de testes analisaram-se as amostras 5.1, 5.2, 20.1, 20.2, apresentadas nas Figuras 23.



Figura 22 - Amostras do primeiro dia de análises sensoriais, amostras 1.1, 1.2, 3.1, 3.2.



Figura 23 – Amostras do segundo dia de análises sensoriais, amostras 5.1, 5.2, 20.1, 20.2.

4.3.1 Resultados do teste de escala hedônica

A ficha de teste de escala hedônica apresenta adjetivos que descrevem a infusão de chá relativamente aos seus atributos de cor, aroma, sabor, doçura e amargor. Esta escala varia gradualmente de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo), com base nesta escala os provadores expressaram sua opinião sobre as amostras. Considerando as respostas obtidas através do teste de escala hedônica, se apresenta na Tabela 14 as médias dos atributos sensoriais avaliados entre as 8 amostras de infusões de chá preto. Os resultados apresentados

levam em consideração que médias seguidas de letras iguais, não diferem significativamente entre si, considerando um nível de significância de 5% (Anjos, 2009).

Os resultados mostram que a amostra 3.1 (1ª infusão – 3 minutos), foi a melhor avaliada quando comparadas as demais amostras. A amostra 1.2 (2ª infusão – 1 minuto) foi amostra com menor avaliação nos atributos considerados. Quando comparamos as amostras de mesmo tempo de infusão e diferente extração da folha de chá, verifica-se que as amostras referentes à 2ª extração da folha de chá obtiveram notas inferiores ou sem diferença significativa em relação às amostras da 1ª extração da folha de chá.

Tabela 14 – Média dos atributos sensoriais avaliados através do teste de escala hedônica de nove pontos em amostras de infusões de chá preto, n=25.

Amostra*	Cor	Aroma	Sabor	Doçura	Amargor
1.1	6,1 ^c	5,88 ^c	5,78 ^c	5,76 ^{ab}	5,92 ^{ab}
1.2	5,205 ^d	4,88 ^e	4,98 ^d	5,06 ^c	5,24 ^c
3.1	7,94 ^a	7,14 ^a	6,76 ^a	5,92 ^a	6,18 ^a
3.2	6,73 ^{bc}	6,14 ^{bc}	6,06 ^b	5,94 ^a	6,12 ^a
5.1	7,02 ^b	6,4 ^b	6,02 ^b	5,48 ^b	5,475 ^{bc}
5.2	5,8 ^c	5,48 ^c	5,66 ^c	5,52 ^b	5,28 ^c
20.1	7,28 ^b	6,32 ^b	5,7 ^c	5,04 ^c	5,26 ^c
20.2	5,32 ^d	5,14 ^d	5,32 ^c	5,42 ^{bc}	5,635 ^b

* Código da amostra, sendo o primeiro número referente ao tempo de infusão, seguido do número da extração realizada.

Médias com mesmo sobre-escrito, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si a $p < 0,05$.

Podemos ainda perceber em relação aos resultados (Tabela 14), que os atributos cor, aroma e sabor, são aqueles em que ocorre maior variação significativa entre amostras, e também quando se comparam entre si as amostras de mesmo tempo de infusão e diferentes extrações. São exceções as amostras de 20 minutos, onde não houve variação significativa dos resultados para o atributo sabor.

Ao contrário dos resultados obtidos com o teste de escala hedônica desenvolvido neste estudo, Lee *et al.* (2013) avaliaram os atributos da infusão de chá verde coreano através de análise sensorial descritiva e por GC-MS, e concluíram que as infusões de chá obtidos pela primeira e segunda extração da folha de chá verde coreano possuem características de sabor muito semelhantes. No entanto estes autores referem nas suas conclusões que seria

necessária mais investigação para verificar se os resultados se aplicavam a outros chás.

Hicks *et al.* (1996) observaram que o flavour permanece na segunda e terceira infusão de chá feito a partir de folhas de chá, porém em seu estudo está descrito apenas a permanência do flavour, e não refere se as diferenças foram significativas.

4.3.2. Resultados do teste de preferência

Nos gráficos apresentados abaixo (Figuras 24 e 25), encontram-se os resultados obtidos através do teste de preferência realizado nos dois dias de testes, onde se avaliaram as amostras 1.1, 1.2, 3.1, 3.2, 5.1, 5.2, 20.1, 20.2. As amostras foram também neste caso avaliadas duas vezes por cada provador. No gráfico apresenta-se uma média dos resultados obtidos para cada amostra.

A Figura 24 expõe os resultados sobre a preferência das infusões de chá no primeiro dia de testes, onde os provadores avaliaram as amostras de 1 e 3 minutos de infusão e 1ª e 2ª extração da folha de chá. Pode verificar-se que a amostra 3.1 (1ª extração – 3 minutos) obteve a maior preferência, tendo sido a preferida de 76% dos provadores, segue-se a amostra 3.2 com uma preferência de 16% e a amostra 1.1 com 8%. A amostra 1.2, referente ao tempo de infusão de 1 minuto e proveniente da segunda extração da folha não foi preferida por nenhum dos provadores.

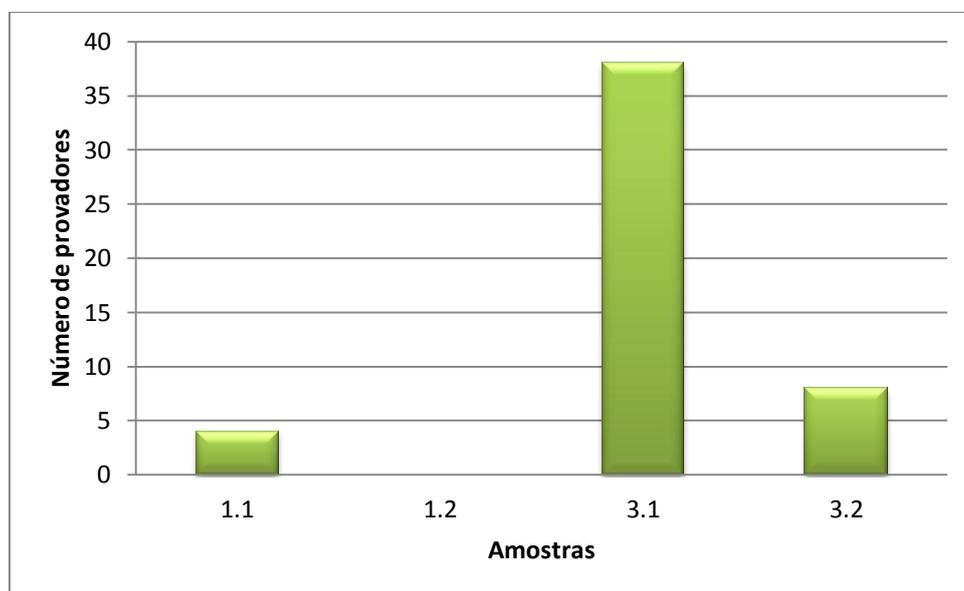


Figura 24 – Resultados do teste de preferência relativo às amostras de chá preto avaliadas no primeiro dia de testes, n=50.

* Código da amostra, sendo o primeiro número referente ao tempo de infusão, seguido pelo número que informa a extração da folha.

Quando confrontamos os resultados do teste de preferência com o teste de escala hedônica, observamos que a amostra 3.1, que obteve maior preferência, também foi a amostra que alcançou maiores notas na avaliação dos atributos sensoriais pelo teste de escala hedônica. Também para a amostra 1.2 os resultados foram coerentes, esta não teve a preferência de nenhum provador e foi a amostra que apresentou as menores notas na avaliação dos atributos sensoriais.

As respostas sobre a preferência dos provadores com relação às amostras apresentadas no segundo dia de testes, avaliação das amostras de 5 e 20 minutos de infusão e 1ª e 2ª extração da folha de chá, estão apresentadas na Figura 25. De acordo com os resultados obtidos, 44% dos provadores preferiram a amostra 20.1, seguida da amostra 5.1 com 36%, com menor percentagem as amostras 20.2 e 5.2 com 12% e 8% da preferência respectivamente.

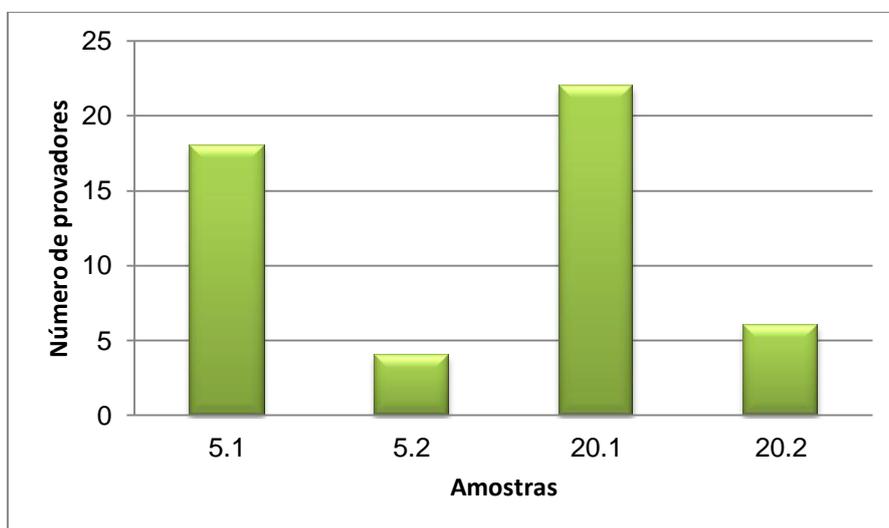


Figura 25 – Resultados do teste de preferência relativo às amostras de chá preto avaliadas no segundo dia de testes, n=50.

* Código da amostra, sendo o primeiro número referente ao tempo de infusão, seguido pelo número que informa a extração da folha.

As amostras 20.1 e 5.1, que foram as amostras com maior preferência dos provadores no segundo dia de testes, também alcançaram notas mais altas no teste de escala hedônica quando comparadas com as amostras 5.2 e 20.2, avaliadas no mesmo dia de testes. Os provadores demonstraram assim uma preferência pelas infusões de chá preparadas com a primeira extração da folha de chá em todos os tempos de extração.

Posteriormente ao questionamento sobre qual seria a amostra preferida, deu-se espaço aos provadores para relatarem o porquê de sua preferência. Este ponto não obteve resposta de todos os provadores. Não se considera que esta resposta fosse essencial, mas

sim de acréscimo ao estudo. Os provadores que indicaram possuir preferência pelas amostras 3.1, 5.1 e 20.1, descreveram como fator decisivo para esta escolha a cor e sabor mais intensos das amostras. Já os que apresentaram preferência pelas amostras 1.1, 3.2, 5.2 e 20.2, justificaram preferir estas amostras justamente por possuírem cor e sabor mais suaves, quando comparadas as outras amostras.

4.3.3. Consumo de chá pelos provadores

Relativamente aos hábitos de consumo de chá preto dos provadores, 58% relataram possuir um consumo ocasional, 30% um consumo frequente e 12% não consomem. Estes resultados encontram-se apresentados na Figura 26 onde foram contabilizadas as respostas dos participantes nos dois dias de testes, totalizando 50 participantes.

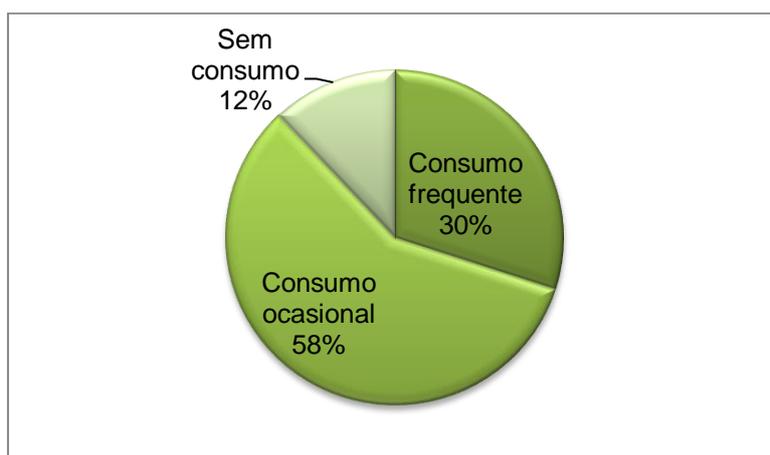


Figura 26 – Consumo de chá preto pelos participantes da análise sensorial, n=50.

De acordo com uma pesquisa realizada pelo Nacional Diet and Nutrition Survey (NDNS) com 7.000 adultos do Reino Unido, 77% das pessoas bebem chá, com um consumo médio de 2,3 canecas (540 ml) por dia (Henderson *et al.* 2002). Os homens e mulheres demonstraram beber quantidades semelhantes, enquanto que 46% bebem chá sem açúcar (52% mulheres, 39% homens). Os consumidores com idade entre 50 e 64 anos consomem mais chá preto do que aqueles com idade entre 19 e 24 anos (consumo médio de 644 contra 298 ml). Em um estudo realizado na Irlanda por Balduino (2012), a pesquisadora observou que o tipo de chá consumido preferencialmente pelos provadores foi o chá preto com a maior porcentagem - 39%, quando comparado ao consumo de outros tipos de chás (chá verde, mistura de chás e chás de ervas medicinais). Relativamente à população participante no nosso

estudo pode-se observar que o consumo de chá é predominantemente ocasional, diferente do exposto pelos autores acima, uma razão para isso será o fato das pesquisas referidas terem sido realizadas em países em que o hábito de beber chá está muito enraizado, ao contrário do que acontece no Brasil.

5

CONCLUSÃO

Este estudo foi proposto com o intuito de desmistificar a ideia que têm muitos consumidores em relação ao teor de cafeína do chá, já que muitos pensam que este está diretamente relacionado com o tempo de infusão, associando que infusões com menor tempo permitiriam obter uma infusão chá com menor teor de cafeína.

Propôs-se através deste estudo quantificar a cafeína presente em infusões de folhas de chá preto Pekoe da Gorreana (Açores), utilizando para isto a cromatografia gasosa (GC). Para o método de preparação da infusão de chá se assemelhar ao máximo ao realizado pelo consumidor, as infusões foram feitas adotando o processo de preparação descrito no rótulo do produto comercial. Comparou-se esse valor com os de chás obtidos com o mesmo produto, mas com diferentes tempos de infusão e métodos de preparação, tendo-se feito uma primeira e uma segunda extração da folha de chá.

Para a extração da cafeína a partir das amostras de infusões de chá, desenvolveu-se neste estudo uma técnica envolvendo a liofilização das amostras. A extração da cafeína com clorofórmio sucedeu a partir das amostras liofilizadas, ao invés de uma extração diretamente da fase aquosa. Este processo é inovador para extração de cafeína com clorofórmio, e demonstrou ser de grande eficácia.

Mesmo sabendo que há métodos mais exatos para a quantificação de cafeína, o uso da Cromatografia Gasosa, mostrou-se adequado às intenções do estudo.

Através dos resultados obtidos pelas análises cromatográficas verificou-se que a diferença mais significativa de teor de cafeína nas infusões se observa entre amostras obtidas em extrações sucessivas. A diferença do tempo de extração, particularmente se estes não forem muito elevados da ordem de grandeza dos usados na preparação de um chá, tem um impacto bastante inferior devido à grande solubilidade da cafeína em água a temperatura elevada. É aqui essencial salientar que este foi o objetivo norteador deste estudo, e não a quantificação em si do teor total de cafeína em cada amostra.

Concluiu-se que obter um chá com baixo teor de cafeína depende, sobretudo, da realização de uma segunda extração, ou mesmo mais extrações aquosas da folha de chá, ao invés da elaboração de um chá com pouco tempo de infusão.

A aplicação de testes de análise sensorial teve a finalidade de complementar o estudo, buscando a opinião dos consumidores sobre as infusões de chá analisadas. Esta análise veio demonstrar que as infusões de chá referentes à primeira extração aquosa da folha, apresentaram maior preferência e melhor avaliação dos atributos sensoriais em relação as amostras da segunda extração da folha de chá. Porém este resultado não é negativo para as amostras provenientes da segunda extração da folha de chá, pois é conhecido que a infusão de chá altera suas características sensoriais a cada infusão e cada indivíduo possui uma opinião particular.

O fato de haver poucos estudos publicados envolvendo este tipo de análise sensorial em chás dificultou a análise dos nossos resultados comparativamente com os de outros autores. No entanto esta é uma área de estudo em expansão, e que nos permite agregar a opinião dos consumidores ao trabalho realizado em laboratório.

As informações que são apresentadas neste estudo podem ser bastante relevantes para o consumidor, pois permitirão com base na técnica de preparação do chá, e por um processo simples, ajustar as suas características e o conteúdo em cafeína.

Atendendo às conclusões deste trabalho é possível propor outros estudos para complementar os resultados obtidos, como análise de outros tempos de infusão, múltiplas extrações da folha e chá e uso de outros chás.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alma Lusa (2012). Disponível em: <http://almalusa.blogs.sapo.pt/580024.html>. Acesso em: 02 de abril de 2014.
- Almeida, J. (2013). A colheita do chá recriada na Antena 1. Disponível em: [http://www.rtp.pt/acoresh/index.php/\\$28\\$?article=32161&visual=3&layout=10&tm=6](http://www.rtp.pt/acoresh/index.php/28?article=32161&visual=3&layout=10&tm=6). Acesso em: 07 de abril de 2014.
- Anjos, A. (2009). Análise de Variância. Notas de Aula. Disponível em: <http://www.est.ufpr.br/ce003/material/apostilace003.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2014.
- April 5 advertising architects (s.d.). Disponível em: <http://april5.de/projekte/klassische-kampagne.60>. Acesso em: 25 de abril de 2014.
- Arctander, S. (1969). *Perfume and Flavour Chemicals*. Montclair, USA.
- Ashihara, H.; Sano, H.; Crozier, A. (2008). Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, 69, 841–856.
- Astill, C.; Birch, M. R.; Dacombe, C.; Humphrey, P. G.; Martin P. T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5340–5347.
- Balduino, M. A. (2012). *Aplicação da metodologia de engenharia Kansei na análise de consumo de chás*. Tese de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território. (DGAOT).
- Bhattacharyya, N.; Seth, S.; Tudu, B.; Tamuly, P.; Jana, A.; Gosh, D.; Bandyopadhyay, R.; Bhuyand, M.; Sabhapandit, S. (2007). Detection of optimum fermentation time for black tea manufacturing using electronic nose. *Sensors and Actuators*, 122, 627–634.
- Borse, B. B., L.; Jagan M. R.; Nagalakshmi, S; Krishnamurthy, N. (2002). Fingerprint of black teas from India: identification of the region-specific characteristics. *Food Chemistry*, 79, 419-424.
- Burdock, G. A. (2004). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. 5th Edition, CRC Press.

- Chan, E. W.; Soh, E. Y.; Tie, P. P.; Law, Y. P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, 3, 266-272.
- Clifford, M. N.; Ramirez-Martinez, J. R. (1990). Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, 35, 13–21.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (1997). *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 7ª ed., Editora da UNICAMP: Campinas.
- Conselho Nacional de Saúde (2012). *Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012*. Brasil.
- Dutcosky, S. D. (1996). *Análise Sensorial de Alimentos*. Curitiba: Champagnat.
- Dutta, R.; Stein, A.; Bhagat, R. M. (2011). Integrating satellite images and spectroscopy to measuring green and black tea quality. *Food Chemistry*, 127, 866–874.
- El-Shahawi, M. S.; Hamza, A.; Bahaffi, S. O.; Al-Sibaai, A. A.; Abduljabbar, T. N. (2012). Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134, 2268-2275.
- Esteves, E. (2009). *Análise Sensorial – Curso de Engenharia Alimentar*. Área Depart. Engª Alimentar, Instituto Superior Engenharia – U. Algarve, Faro.
- ETS Laboratories (2014). Disponível em: <https://www.etslabs.com/images/methods/11.gif>. Acesso em: 15 de setembro de 2014.
- FAO (2012). *Internationally coordinated action for the promotion of tea consumption*. Committee on Commodity Problems—Intergovernmental Group on Tea, 22th Session. Colombo, Sri Lanka, 30 January - 1 February 2012.
- Ferreira, V. L. P.; Almeida, T. C. A.; Pettinelli, M. L. C. V.; Silva, M. A. A. P.; Chaves, J. B. P.; Barbosa, E. M. de M. (2000). *Análise Sensorial: testes discriminativos e afetivos. Manual: série qualidade*. Campinas, SBCTA.
- Friedman, M.; Kim, S. Y.; Lee, S. J.; Han, G. P.; Han, J. S.; Lee, K. R.; Kozukue, N. (2005). Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States, *Journal of Food Science*, 70, 550-559.
- Gorrena (2011). Disponível em: <http://www.gorreana.org/index.php/pt/somos>. Acesso em: 02 de abril de 2014.
- Gracindo, I. (2003). *Viagem ao mundo do chá*. 1.ed. Rio de Janeiro, Casa da Palavra.
- Graham, H. N. (1999). *Tea*. In: Frederick JF, editor. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.
- Harold, N.; Graham, P. D. (1992). Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21, 334–350.
- Harbowy, E. M.; Balentine, D.; Davies A.; Cai Y. (1997). Tea Chemistry, Critical Reviews. *Plant Sciences*, 16, 415-480.
- Hayashi, N.; Ujihara, T.; Chen, R.; Irie, K.; Ikezaki, H. (2013). Objective evaluation methods for the bitter and astringent taste intensities of black and oolong teas by a taste sensor. *Food Research International*, 53, 816–821.

- Henderson, L.; Gregory, J.; Swan, G. (2002). *National Diet and Nutrition Survey: adults aged 19 to 64 years*. Food Standards Agency: London.
- Hicks, M. B.; Hsieh, Y-H. P.; Bell, L. N. (1996). Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. *Food Research*, 29, 325–330.
- Ho, C. T.; Chen, C. W.; Wanasundara, U. N.; Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants from tea in natural antioxidants*. Champaign, IL: AOCS Press.
- Horžić, D.; Komes, D.; Belščak, A.; Ganić, K.; Iveković, D.; Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441–448.
- IFT - Institute of Food Technologists (1981). *Sensory evaluation guide for testing food and beverage products*. Sensory Evaluation Division, Institute of Food Technologists. *Food Technology*, 35, 50-59.
- Jorge S. (s.d). INETI, DTIQ. Acerca do chá – Breve nota histórica. Disponível em: <http://www.cienciaviva.pt/proyectos/pulsar/cha.asp>. Acesso em: 29 de março de 2014.
- Joshi, R.; Babu, G. D.; Gulati, A. (2013). Effect of decaffeination conditions on quality parameters of Kangra orthodox black tea. *Food Research International*, 53, 693–703.
- Kato, M.; Shibamoto, T. (2001) Variation of Major Volatile Constituents in Various Green Teas from Southeast Asia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3), 1394-1396.
- Khan, N.; Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519-533.
- Komes, D.; Horžić, D.; Belščak, A.; Kovačević Ganič, K.; Baljak, A. (2009). Determination of caffeine content in tea and maté tea by using different methods. *Czech Journal of Food Science*, 27, 213-216.
- Krull, I.; Swartz M. (1998). Quantitation in method validation. *LC-GC*, 16, 1084–1090.
- Kumar, N. S.; Hewavitharanage, P.; Adikaram, N. K. B. (1995). Attack on tea by *Xyleborus fornicatus*: inhibition of the symbiote, *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. *Phytochemistry*, 40, 1113–1116.
- Lawless, H. T.; Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food*, 2nd. Edition. Food Science Text Series, 19. © Springer Science & Business Media, LLC.
- Lee, J.; Chambers, D.; Chambers, E. (2013). Sensory and Instrumental Flavor Changes in Green Tea Brewed Multiple Times. *Foods*, 2, 554-571.
- Li, Y. H.; Gu, W.; Ye, S. (2007). Expression and location of caffeine synthase in tea plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 698–701.
- Liang, Y.; Lu J.; Zhang, L.; Wu, S.; Wu, Y. (2003). Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80, 283–290.
- Lima, J.; Mazzafera, P.; Moraes, W.; Silva, R. (2009). Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, 39, 1270-1278.

- Lin, Y.; Wu, S.; Lin, J. (2003). Determination of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Flowers (*Camellia sinensis*) and Their Hydroxyl Radical Scavenging and Nitric Oxide Suppressing Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 975-980.
- Macfarlane, A.; Macfarlane, I. (2004). *The Empire of Tea*. The Overlook Press: New York.
- Maidon, A.; Mansoer, A. O.; Sulistyarti, H. (2012). Study Of Various Solvents For Caffeine Determination Using Uv Spectrophotometric. *Journal of Applied Sciences Research*, 8, 2439-2442.
- Matsubara, S.; Rodruguez-Amaya, D. B. (2006). Teores de catequinas e teafloavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 401-407.
- McGee, H. (2011). *On food and cooking: the science and lore of the kitchen*. New York, Scribner.
- Mukhopadhyay, S.; Mondal, A.; Poddar, M. K. (2003). Chronic administration of caffeine: Effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41, 283-289.
- Moraes, M. A. C. (1988). *Métodos para avaliação sensorial dos alimentos*. 6. ed. Campinas: Editora da Unicamp.
- Mumin, M. A.; Akhter, K. F.; Abedin, M. Z.; Hossain, M. Z. (2006). Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee and Soft Drinks by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE-HPLC). *Malaysian Journal of Chem.*, 8, 45-51.
- Ngure, F. M.; Wanyoko, J. K.; Mahungu, S. M.; Shitandi, A. A. (2009). Catechins depletion patterns in relation to theaflavin and thearubigins formation. *Food Chemistry*, 115, 8-14.
- Noronha, J. F. (2003). *Apontamentos de Análise Sensorial, Análise Sensorial – Metodologia*. ESAC, Coimbra.
- Obanda, M.; Owuor, P. O. (1997). Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 209-215.
- Owuor, P. O.; Obanda, M.; Nyirenda, H.; Mphangwe, N.; Wright, L.; Apostolides Z. (2006). The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa. *Food Chemistry*, 97, 644-653.
- Owuor, P. O.; Obanda, M.; Hastings, E.; Nyirenda, H.; Mandala, W. (2008). Influence of region of production on clonal black tea chemical characteristics. *Food Chemistry*, 108, 263-271.
- Pascoal, P.; Sousa, S. (2012). O património perto de si – A cultura do chá em São Miguel. Açoriano Oriental. 22 de abril de 2012.
- Perva-Uzunalic', A.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Weinreich, B.; Otto, F.; Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96, 597-605.
- Ravichandran, R.; Parthiban, R. (1998a). The impact of mechanization of tea harvesting on the quality of the South Indian CTC teas. *Food Chemistry*, 63, 61-64.

- Ravichandran, R.; Parthiban, R. (1998b). Changes in enzyme activities (PPO and PAL) with type of tea leaf & during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhool on black tea quality. *Food Chemistry*, 62, 277– 281.
- Sereshti, H.; Samadi, S. (2014). A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. *Food Chemistry*, 158, 8-13.
- Srivas, K.; Wu., H-F. (2007). Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1170, 9–14.
- Strahl, N. R.; Lewis, H.; Fargen, R. (1977). Comparison of gas chromatographic and spectrophotometric methods of determination for caffeine in coffees and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 233–235.
- Tanaka, T.; Kouno, I. (2003). Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. *Food Science and Technology Research*, 9, 128-133.
- Vasundhara Sharma; L. Jagan Mohan Rao (2009). A Thought on the Biological Activities of Black Tea, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 379-404.
- Yamanishi, T.; Hara, Y.; Luo, S.; Wickremasinghe, R. L. (1995). Special issue on tea. *Food Reviews International*, 11, 371–546.
- Wink, M. (1993). *Quinolizidine Alkaloids*, in: P.G. Waterman (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 8.
- Wu, C.; Yamada, K.; Sumikawa, O.; Matsunaga, A.; Gilbert, A.; Yoshida, N. (2012) Development of a methodology using gas chromatographycombustion-isotope ratiomass spectrometry for the determination of the carbon isotope ratio of caffeine extracted from tea leaves (*Camellia sinensis*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26, 978–982.

ANEXOS

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ANEXO II – Ficha para Análise Sensorial de Chá Preto.

ANEXO III – Cromatogramas

ANEXO IV – Projeto de pesquisa encaminhado ao CEP - Análise sensorial do chá preto (*Camellia sinensis*) submetido a diferentes métodos de extração.

ANEXO V – Pôster de divulgação do trabalho no 12º Encontro de Química dos Alimentos- de 10 a 12 de Setembro de 2014

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Análise sensorial do chá preto (*Camellia sinensis*) submetido a diferentes métodos de extração”.

Para este estudo adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): Análise sensorial. Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este estudo apresenta risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras. Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de Identidade _____, fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Porto Alegre, __ de _____ de 2014.

Assinatura do (a) participante

Assinatura do (a) pesquisador (a)

ANEXO II
FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

Você está recebendo amostras de chá codificadas, avalie-as segundo a escala hedônica abaixo, quanto aos atributos: AROMA, COR, SABOR, DOÇURA E AMARGOR. Utilize o Quadro de avaliação para deixar sua opinião.

ESCALA HEDÔNICA DE PONTOS

9 – Gostei muitíssimo
8 - Gostei muito
7 – Gostei moderadamente
6 – Gostei ligeiramente
5 – Não gostei /nem desgostei
4 – Desgostei ligeiramente
3 – Desgostei moderadamente
2 – Desgostei muito
1 – Desgostei muitíssimo

Quadro de avaliação

Amostra	AROMA	COR	SABOR	DOÇURA	AMARGOR

Teste de Preferência

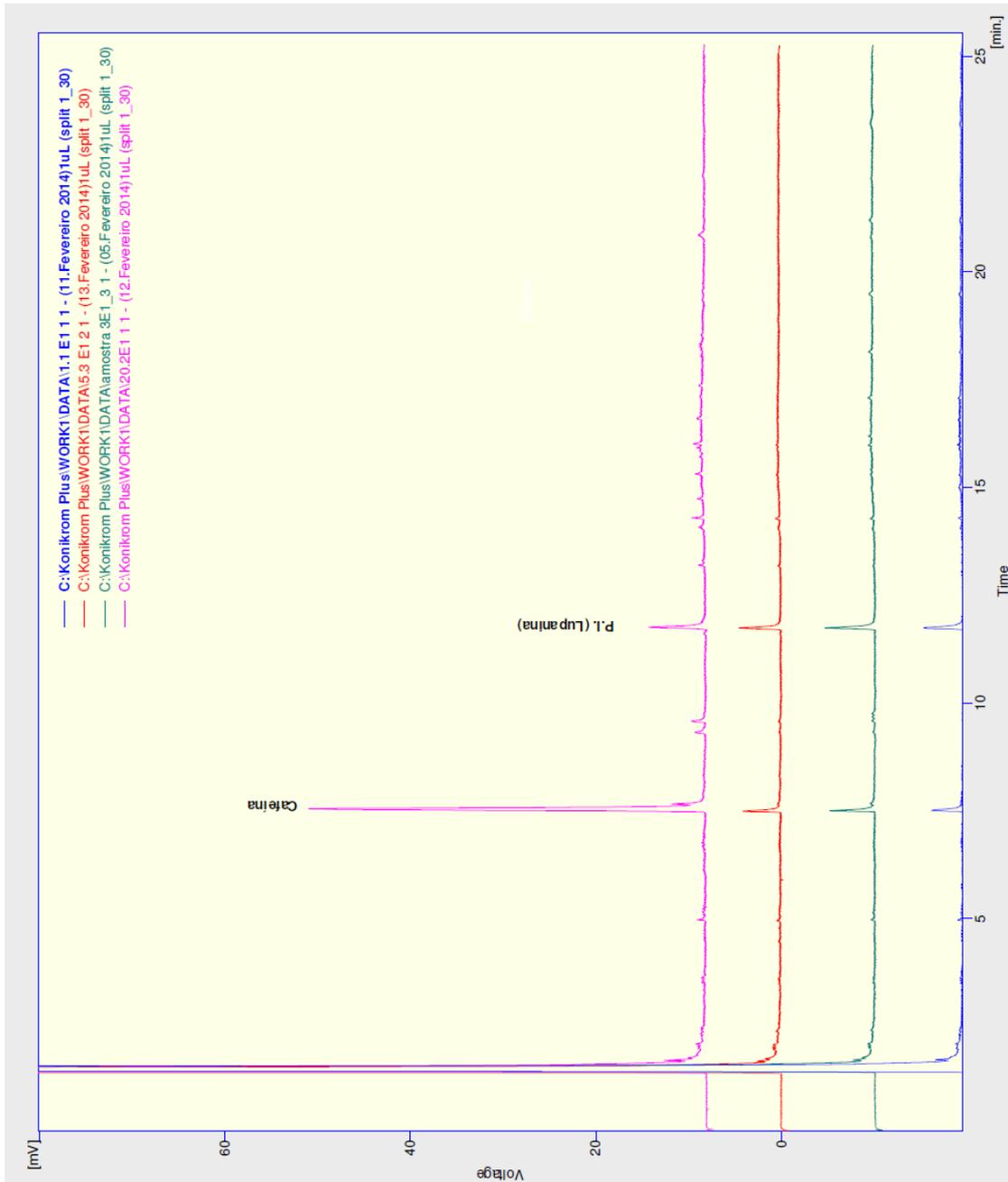
Após degustar as amostras acima indique a sua amostra de preferência: _____

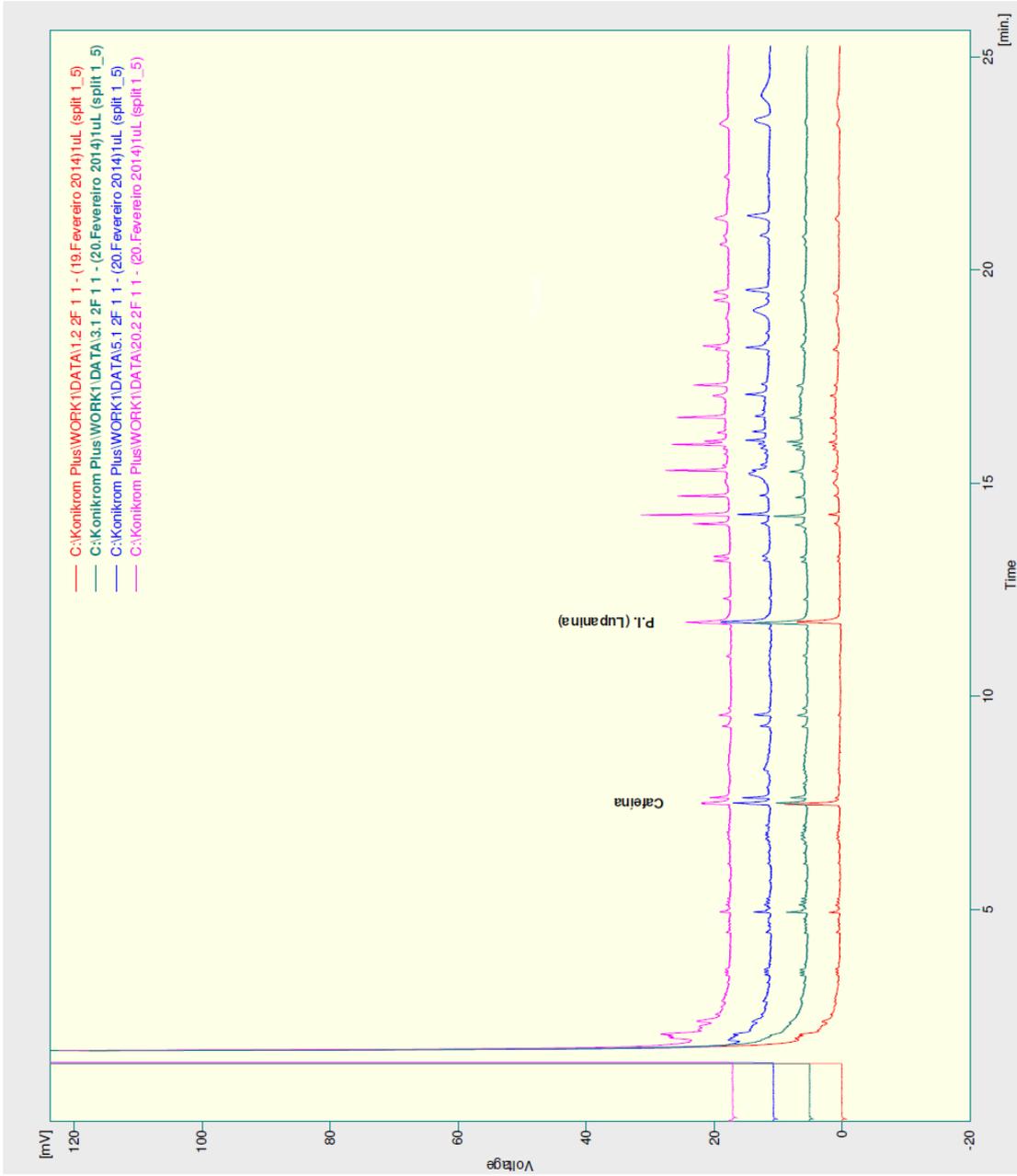
Dê a razão da sua preferência:

Frequência do consumo do produto objeto do teste:

- () Tomo frequentemente
- () Tomo ocasionalmente
- () Nunca tomo

ANEXO III CROMATOGRAMAS





ANEXO IV
Projeto de Pesquisa encaminhado ao CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

UFCSPA

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

Marcella Loebler Nascimento

ANÁLISE SENSORIAL DO CHÁ PRETO (*CAMELLIA SINENSIS*) SUBMETIDO A
DIFERENTES METODOS DE EXTRAÇÃO

Porto Alegre

2014

Marcella Loebler Nascimento

Análise sensorial do chá preto (*camellia sinensis*) submetido a diferentes métodos de extração

Projeto De Pesquisa Em Ciências
Gastronômicasna Universidade De Ciências Da Saúde De
Porto Alegre – UFCSPA

Orientadora: Prof^a. Dra. Valdeni Terezinha Zani

Co-orientadores: Prof^a.Me. Isabel Cristina Kasper Machado

Prof.Dr.Juliano Gravaglia

Porto Alegre

2014

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Instituição onde será realizado o projeto:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmiento Leite, 245 – Centro, Porto Alegre – RS

CEP: 90050-170

Telefone: (51) 3303-8841

Fax: (51) 3303-8810

Título do projeto: Análise sensorial do chá preto (*camellia sinensis*) submetido a diferentes métodos de extração.

Pesquisador Responsável:

Prof^ª. Dra. Valdeni Terezinha Zani

Local da pesquisa:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Apresentação: Este estudo será desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), e possui como título “Análise sensorial do chá preto (*Camellia sinensis*) submetido a diferentes métodos de extração”. A pesquisa tem por objetivo avaliar sensorialmente o chá preto da Gorreana Pekoe, proveniente da Fábrica de Chá Gorreana, S. Miguel – Açores. A elaboração do chá para análise sensorial se procederá com diferentes tempos de infusão das folhas de chá (1, 3, 5 e 20 minutos) e métodos de extração (1ª e 2ª extração das mesmas folhas de chá). Os teores de cafeína assim como as características químicas e sensoriais podem variar de acordo com as técnicas de preparo das infusões. Para participar serão convidados os alunos dos cursos de Gastronomia e Tecnologia de Alimentos, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Palavras-chave: Chá preto. *Camellia Sinensis*. Cafeína. Análise sensorial.

1 INTRODUÇÃO

O chá com suas diversas características conquistou o mundo, modificou costumes, ganhou grandes admiradores e mudou economias. Por suas propriedades benéficas à saúde, ou por sua riqueza de sabores e aromas, é consumido pelos quatro cantos do mundo. Esta bebida de grande popularidade é feita a partir da infusão de folhas de *Camellia sinensis*, tendo grande importância mundialmente, tanto socioeconômica como cultural (Lima *et al.*, 2009). Com base no grau de fermentação, o chá é classificado em chá verde (não fermentado), chá oolong (semi-fermentado) e chá preto (totalmente fermentado) (Chen *et al.*, 2011).

Em contraste com alguns países asiáticos, como China e Índia, onde beber chá é um ritual e um estilo de vida, em muitos países europeus o consumo de chá não é frequente e as pessoas ainda preferem vários tipos de infusões de frutas e ervas, como exemplo, camomila, cidreira e tília. No consumo de chá também difere o tipo de chá e a sua preparação. Habitualmente, em algumas partes do mundo, o chá é infundido várias vezes, realizando-se extrações repetidas ou preparadas com água em temperaturas diferentes (Horžic' *et al.*, 2009).

Comumente os países ocidentais bebem maior quantidade de chá preto, feito por uma infusão de uma quantidade de folhas (normalmente contido em um saquinho de chá) em água fervente, em uma panela, bule ou, cada vez mais, em copo ou caneca. O tempo de infusão é geralmente curto (<3 min) e a bebida é normalmente consumida quente (com ou sem leite e/ou açúcar) (Astill *et al.*, 2001). Harold McGee refere em seu livro, *Comida & Cozinha – Ciência e Cultura da Culinária* (2011), que no Ocidente, a infusão geralmente é feita com uma quantidade relativamente pequena de folhas de chá preto, uma colher de chá pequena (2 a 5 g) para uma xícara (180 ml). As folhas são colocadas em infusão uma única vez e depois descartadas.

Astill *et al.* (2001) comprovaram que as variáveis de preparação tem um efeito marcante sobre a composição da bebida final. Os efeitos dos fatores referidos causam diferenças na composição química do chá, o que é importante, pois a qualidade e as propriedades da bebida consumida estão associadas aos componentes químicos, em particular os polifenóis e a cafeína extraídos a partir da folha (Astill *et al.* 2001).

A cafeína é um alcaloide presente em sementes, folhas e raízes de algumas plantas, como o café (*Coffea arabica*), chá (*Camellia sinensis*) ou o cacau (*Theobroma cacao*). Possui estrutura química de metilxantina tal como os outros alcaloides que co-ocorrem nestas espécies vegetais, a teobromina e a teofilina. Estes pertencem a uma categoria de alcaloides com propriedades bioativas que exibem efeitos farmacológicos atuando no sistema nervoso central, coração, sistema nervoso periférico, rins, trato gastrointestinal e sistema respiratório (Komes *et al.*, 2009). Devido ao grande consumo de cafeína através dos alimentos, é de grande importância a sua quantificação.

A influência do tempo de infusão das folhas de chá, e a realização de múltiplas extrações a partir da mesma folha, estão relacionados com a quantidade de cafeína liberada (Horžic' *et al.*, 2009 e El-Shahawi *et al.*, 2012). Segundo El-Shahawi *et al.* (2012), a presença de cafeína no chá aumenta de acordo com que se eleva o tempo de infusão, comprovando através de seu estudo em que trabalhou com os tempos de 5, 15 e 30 minutos. Já Horžic' *et al.*,(2009), analisou que conforme se realizavam extrações consecutivas com a mesma folha de chá o teor de cafeína presente diminuía.

Assim como a composição química se altera de acordo com o modo de preparo as características sensoriais também são alteradas. O sabor é um dos fatores sensoriais mais importantes para decidir a qualidade dos alimentos. Embora seja tipicamente avaliado por uma sensação gustativa, o teste sensorial pode ser potencialmente afetado por preferência individual, por condições físicas e mentais (Hayashi *et al.*, 2013).

A análise sensorial de produtos alimentares é muito importante, pois ela fornece indicações fundamentais para a produção e comercialização dos produtos, no tocante às preferências e exigências do consumidor. Uma dessas indicações é a nota média de aceitação atribuída a cada uma das propriedades, como cor, aroma, sabor e aparência de um produto, ou de diferentes marcas, ou ainda de variações de um produto (Silva & Azevedo, 2009).

Testes afetivos são provas sensoriais usadas para a valorização (ou classificação) da preferência e/ou aceitação dos produtos por provadores sem treino prévio, selecionados de entre consumidores de acordo com critérios que variam com o objetivo do teste (área geográfica, tipo de ocupação, nível social e econômico). Estes testes sensoriais permitem descrever, simultaneamente, várias características num ou mais produtos. Aos provadores são fornecidas escalas para avaliarem a intensidade das sensações provocadas pelos atributos e/ou para "apreciarem", avaliarem hedonisticamente, os produtos (Esteves, 2009).

Em estudo piloto realizado pela pesquisadora com chá preto Pekoe, da marca Gorreana proveniente de Açores, Portugal, na Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa foram encontrados níveis de concentrações distintos de cafeína para cada método de preparo. As técnicas aplicadas e resultados encontrados foram: Com 3 g de folhas de chá, realizada infusão em 500 ml de água, obtiveram-se as seguintes concentrações de cafeína durante a primeira extração da folha: 2,60 mg, 2,98 mg, 3,14 mg e 54,32 mg, para os tempos de infusão de 1, 3, 5 e 20 minutos respectivamente. Para a segunda extração da folha de chá foram quantificadas seguintes concentrações de cafeína: 0,52 mg, 0,10 mg, 0,14 mg e 0,20 mg para os tempos de infusão de 1, 3, 5 e 20 minutos respectivamente.

O presente estudo propõe-se avaliar sensorialmente as diferentes infusões de chá preto Pekoe, da marca Gorreana proveniente de Açores, Portugal com diferentes tempos de infusão (1, 3, 5 e 20 minutos) e diferentes extrações das mesmas folhas de chá (1ª e 2ª

extração). Pretende-se ainda comparar esses resultados com o método de preparo e as concentrações de cafeína presentes nas infusões. Esta comparação ocorrerá a fim de traduzir as conclusões em informações úteis para o consumidor. Promovendo o preparo de uma infusão de chá com menor concentração de cafeína, atendendo a aceitabilidade do provador.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise sensorial das preparações de chá preto realizadas com diferentes métodos de extração por meio de infusão e realizar análise comparativa dos resultados encontrados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise sensorial com diferentes tempos e métodos de extração: tempos de 1, 3, 5 e 20 minutos, realizados a partir da 1ª e 2ª extração da folha de chá preto.
- Avaliar as alterações das características sensoriais entre as infusões de chá, alteradas pelo tempo de infusão e extração.
- Avaliar segundo a percepção do provador as características das infusões de chá e associar com seu método de preparo e sua quantidade de cafeína.
- Perceber a preferência do provador em relação à infusão de chá, comparar este fator com método de preparo e sua quantidade de cafeína.
- Quantificar e comparar os resultados obtidos através da análise sensorial do chá preto.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo quantitativo e qualitativo de delineamento transversal com aplicação de análise sensorial estruturada.

3.2 LOCAL DE ESTUDO

Laboratório do curso de Gastronomia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

3.3 PROCESSO DE ELABORAÇÃO DO CHÁ

Para desenvolvimento deste trabalho será utilizado o chá preto Pekoe da Fábrica de Chá Gorreana, S. Miguel – Açores. Optou-se utilizar a água mineral para não comprometer a qualidade final do chá.

A definição do método de extração da folha foi baseada na descrição do modo de preparação da infusão de chá sugerido na embalagem do Chá Gorreana Pekoe. Que refere a relação massa de folha / volume de água, de uma colher de sopa de folha, 3,30 g para 500 ml de água. O processo de extração aquosa ocorrerá com água à temperatura de ebulição, será preparado quatro chás com 1, 3, 5 e 20 minutos de infusão e diferentes extrações das mesmas folhas de chá (1ª e 2ª extração). Os procedimentos da segunda extração aquosa da folha de chá preto irão ocorrer da mesma forma que na primeira extração, ocorrendo logo após a primeira extração.

3.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Serão convidados a participar da análise sensorial cerca de 50 alunos dos cursos de Gastronomia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

3.4.1 Critérios de inclusão

Alunos maiores de idade dos cursos de Gastronomia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

3.4.2 Critérios de exclusão

Alunos menores de idade dos cursos de Gastronomia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

3.5 COLETA DE DADOS

A coleta de dados irá ocorrer após o esclarecimento sobre o presente estudo, se houver concordância dos participantes, será solicitada assinatura do participante ao TCLE e realizada a análise sensorial.

A análise sensorial será realizada com 50 julgadores não treinados, por meio da aplicação de escala hedônica e teste de preferência (Lawless & Heymann, 2010). O teste de escala hedônica será de 9 pontos, avaliando aspectos como cor, odor, adstringência, amargor e doçura.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas dos resultados deste projeto, as respostas obtidas através da análise sensorial serão submetidas a uma análise de variância (ANOVA) (Esteves, 2009).

3.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto será submetido para avaliação e aprovação do Comitê de ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (CEP- UFCSPA).

O presente estudo referido neste projeto atende as determinações da Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde.

Todos os participantes da pesquisa receberão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser assinado por este.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será explicado e assinado em duas vias por todos aqueles que aceitarem participar da pesquisa. E a todos os participantes será informado que não há riscos e constrangimentos com sua participação, também será assegurado pelos pesquisadores o sigilo dos dados confidenciais.

4 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

O projeto será desenvolvido no período de 30 de junho a 5 de setembro na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Atividades		
	Agosto	Setembro
Pesquisa bibliográfica	X	
Análise sensorial do chá	X	
Análise dos resultados		X

5 ORÇAMENTO

Os custos referentes aos materiais necessários para execução do projeto serão financiados pela pesquisadora Marcella Loebler Nascimento, sendo assim não será solicitado recurso para os custos.

Material	Quantidade	Preço unitário	Total
Xerox	100 und.	R\$ 0,10	R\$ 10,00
Canetas	10 und.	R\$ 1,20	R\$ 12,00
Copos descartáveis	700 und.	R\$ 3,50	R\$ 24,50
Chá preto em folhas	3 pacotes	R\$ 10,00	R\$ 30,00
Água mineral	10 litros	R\$ 1,50	R\$ 15,00
		Total:	R\$ 91,50

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astill, C.; Birch, M. R.; Dacombe, C.; Humphrey, P. G.; Martin P. T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5340–5347.
- Chen, Q.; Zhao, J.; Chen, Z.; Lin, Z.; An Zhao, D. (2011). Discrimination of green tea quality using the electronic nose technique and the human panel test, A comparison of linear and nonlinear classification tools. *Sensors and Actuators B*, 159, 294–300.
- El-Shahawi, M.S.; Hamza, A.; Bahaffi, S.O.; Al-Sibaai, A. A.; Abduljabbar, T.N. (2012). Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*; v. 134(4), p. 2268-2275.
- Esteves, E. (2009). *Análise Sensorial – Curso de Engenharia Alimentar*. Área Depart. Eng^a Alimentar, Instituto Superior Engenharia – U. Algarve, Faro.
- Hayashi, N.; Ujihara, T.; Chen, R.; Irie, K.; Ikezaki, H. (2013). Objective evaluation methods for the bitter and astringent taste intensities of black and oolong teas by a taste sensor. *Food Research International*, 53, 816–821.
- Horžić, D.; Komes, D.; Belščak, A.; Ganić, K.; Iveković, D.; Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441–448.
- Komes, D.; Horžić, D.; Belščak, A.; Kovačević Ganić, K.; Baljak, A. (2009). Determination of caffeine content in tea and maté tea by using different methods. *Czech Journal of Food Science*, 27, 213-216.
- Lawless, H. T.; Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food*, 2nd. Edition. Food Science Text Series, 19. © Springer Science & Business Media, LLC.
- Lima, J.; Mazzafera, P.; Moraes, W.; Silva, R. (2009). Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, 39, 1270-1278.
- McGee, H. (2011). *On food and cooking: the science and lore of the kitchen*. New York, Scribner.
- Obanda, M.; Owuor, P. O. (1997). Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 209-215.
- Silva, F. A. S.; Azevedo, C. A. V. *Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance*. (2009) World Congress On Computers In Agriculture, 2009, Orlando. *Proceedings...* Reno, NV: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Tanaka, T.; Kouno, I. (2003). Oxidation of tea catechins: chemical structures and reaction mechanism. *Food Science and Technology Research*, 9, 128-133.

ANEXO V

PÔSTER – 12º Encontro de Química dos Alimentos

10 a 12 de Setembro de 2014

Instituto Superior de Agronomia – Lisboa



12º Encontro de Química dos Alimentos

DOSEAMENTO DE CAFEÍNA EM CHÁ PRETO COM DIFERENTES TEMPOS DE EXTRACÇÃO

MARCELLA LOEBLER NASCIMENTO*, LUZ FERNANDES, PAULINA MATA, ANA LOURENÇO

REQUIMTE, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA, 2829-516 CAPARICA, PORTUGAL;

*MARCELLALOEBLER@YAHOO.COM.BR

Introdução: Em contraste com alguns países asiáticos, como China e Índia, onde beber chá (*Camellia sinensis*) é um ritual e um estilo de vida, em muitos países europeus o consumo de chá não é frequente e as pessoas ainda preferem vários tipos de infusões de frutas e ervas, como por exemplo camomila, cidreira e tilia.

No consumo de chá também difere o tipo de chá e a sua preparação. Habitualmente, em algumas partes do mundo, o chá é infundido várias vezes, realizando-se extrações repetidas e/ou preparadas com água com temperaturas diferentes (Horžic *et al.*, 2009). O método de preparação vai definir as características da bebida obtida.

A motivação para o presente estudo foi o facto de termos verificado que muitos consumidores consideram que o teor de cafeína está diretamente relacionado com o tempo de infusão, e portanto infusões mais curtas permitirão obter uma bebida com menor teor de cafeína.

O estudo propõe-se quantificar, utilizando a cromatografia gasosa, a cafeína presente em infusões de folhas de chá preto Gorreana (Açores), seguindo o processo de preparação referido no rótulo do produto comercial. Propõe-se ainda comparar esse valor com os de chás obtidos com o mesmo produto, mas com diferentes tempos de infusão e métodos de preparação.

Metodologia:

Utilizou-se o chá preto (*Camellia sinensis*) da Gorreana, Açores, Portugal (Figura 1).

A extração da folha ocorreu seguindo o modo de preparação descrito na embalagem (i.e. relação massa de folha/volume de água). Utilizou-se a massa de folha correspondente a 50 ml de água.



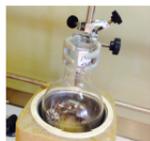
Figura 1: Chá da Gorreana Pekoe.

Prepararam-se infusões de chá com tempos de contacto da água com as folhas de 1, 3, 5 e 20 min. Fizeram-se duas extrações (primeira e segunda extração) das folhas de chá. As amostras obtidas foram liofilizadas e extraídas com clorofórmio (Figura 2).

A análise cromatográfica foi realizada em triplicado por GC-FID. A cada amostra foi adicionada, como padrão interno (PI), lupanina.



a



b

Figura 2: Liofilização das amostras (a) e extração com clorofórmio das amostras liofilizadas (b).



Camellia sinensis



Plantação de *Camellia sinensis*

Resultados:

Tabela: Quantificação de cafeína em amostras obtidas da 1ª e 2ª extração (ext) de folha de chá com diferentes tempos de contacto. Concentração (conc.) em mg de cafeína/3 g de folha e em percentagem.

Tempo (min)	Conc.		% de cafeína	
	mg cafeína / 3 g 1ª ext	mg cafeína / 3 g 2ª ext	(w/w)* 1ª ext	(w/w)* 2ª ext
1	2,60	0,52	0,086	0,018
3	2,98	0,10	0,100	0,004
5	3,14	0,14	0,104	0,004
20	54,32	0,20	1,810	0,006

* Valores multiplicados por dois, uma vez que para a liofilização utilizou-se 25 dos 50 ml de fase aquosa (chá).

Conclusões:

Neste estudo desenvolveu-se uma técnica para extração de cafeína de amostras de infusões de chá, envolvendo a sua liofilização, que se verificou ser eficaz.

Verificou-se que a diferença mais significativa de teor de cafeína nas infusões se observa entre amostras obtidas de extrações sucessivas. A diferença do tempo de extração tem um impacto bastante inferior devido à elevada solubilidade da cafeína em água quente.

Esta informação pode ser bastante relevante para o consumidor, pois permitirá com base na técnica de preparação do chá, e por um processo simples, ajustar o seu conteúdo em cafeína.

Bibliografia:

Horžic, D., Komes, D., Belščak, A., Ganic, K., Ivekovic, D., Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441–448.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a disponibilidade para utilização do equipamento e o apoio técnico prestados pelo Laboratório de Análises REQUIMTE/FCT.

