

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TIAGO DIAS

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ENZIMÁTICO-
ESPECTROFOTOMÉTRICA BASEADA EM TIROSINASE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E
EPICATEQUINA EM ALIMENTOS**

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

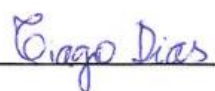
Nome completo do autor: Tiago Dias

Título do trabalho:

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 05/08/2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E
DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

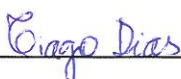
Nome completo do autor: Tiago Dias

Título do trabalho: Desenvolvimento de metodologia enzimático-espectrofotométrica baseada em tirosinase para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 06 / 01 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

TIAGO DIAS

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ENZIMÁTICO-
ESPECTROFOTOMÉTRICA BASEADA EM TIROSINASE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E
EPICATEQUINA EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Alves da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Clarissa Damiani

Co-orientadora: Profa. Dra. Mara Reis Silva

Goiânia
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Dias, Tiago

Desenvolvimento de metodologia enzimático-espectrofotométrica
baseada em tirosinase para quantificação de catequina e epicatequina
em alimentos [manuscrito] / Tiago Dias. - 2016.
89 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Alves da Silva; co-orientadora Dra.
Clarissa Damiani; co-orientador Dr. Mara Reis Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Catequina. 2. Epicatequina. 3. Espectrofotometria. 4. Método.
5. Tirosinase. I. da Silva, Flávio Alves, orient. II. Título.

CDU 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE TIAGO DIAS. Aos vinte e três dias do mês de agosto de 2016 (23/08/2016), às 08h30min, reuniram os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Flávio Alves da Silva – Orientador – EA/UFG, o Prof. Dr. Francielo Vendruscolo – EA/UFG e a Profa. Dra. Lidiane Batista Muniz –FANUT/UFG, para sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no Miniauditório Jatobá, da Faculdade de Nutrição/UFG, proceder a avaliação da defesa de dissertação intitulada: “Desenvolvimento de metodologia enzimático-espectrofotométrica baseada em tirosinase para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos”, em nível de MESTRADO, área de concentração em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, de autoria de **TIAGO DIAS**, discente do Programa de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Flávio Alves da Silva, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação, que, em trinta minutos, procedeu a apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca fez arguição do examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa, tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1010/2011 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e procedidas às correções recomendadas, a dissertação foi **Aprovada** e, para fins de expedição do diploma de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, na área de concentração em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS pela Universidade Federal de Goiás, a mesma deverá proceder de acordo com as normas, nos termos do artigo 68 da resolução do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11h30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação, e para constar, lavrou-se a presente Ata, que, depois de lida e aprovada, é assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.



Prof. Dr. Flávio Alves da Silva
Presidente – EA/UFG



Prof. Dr. Francielo Vendruscolo
Membro - EA/UFG



Profa. Dra. Lidiane Batista Muniz
Membro – FANUT/UFG

*Para Kely e Maria Luiza,
com todo o meu amor!*

AGRADECIMENTOS

A decisão de cursar o mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, que tomei há quase três anos, trouxe-me a um caminho repleto de desafios e novos conhecimentos. Esses desafios não poderiam ser superados sem a ajuda de pessoas importantes. A essas pessoas eu gostaria de deixar aqui registrado o meu agradecimento.

Primeiramente à minha esposa Kely, que decidiu entrar comigo nessa caminhada, me apoiando e incentivando nos estudos, ao mesmo tempo em que descobríamos as alegrias e desafios de sermos pais da Maria Luiza. Muito obrigado, Kely, por tudo!

À Maria Luiza, que a cada dia nos alegra, com suas descobertas e peripécias. Muito obrigado, minha filha, pelos abraços carinhosos a cada dia.

Aos meus pais, Luiz e Gabriela e à Daiana, minha irmã. Pai, obrigado por ensinar-me a superar os desafios com coragem e determinação. Mãe, obrigado pelos exemplos de fé, determinação e carinho. Daiana, obrigado por ensinar-me a importância de compartilhar. Todos esses valores, com certeza foram muito úteis durante o mestrado.

Aos meus amigos Jean Carlos, Alexandre e Reginaldo, que em momentos difíceis, anteriores a essa caminhada me apoiaram e, com suas amizades, ajudaram-me a fazer a diferença. Muito obrigado, meus amigos!

Ao professor Flávio Alves, e às professoras Clarissa Damiani e Mara Reis, por guiarem-me no árduo processo de pesquisa, pelo apoio e pelas correções. Muito obrigado!

Aos colegas de trabalho e amigos da Universidade Federal de Goiás, que contribuíram para a concretização desta pesquisa, durante o período em que estive afastado para qualificação. Especialmente à Aline e à Camilla que assumiram muitas das minhas tarefas nesse período. Ao Douglas pela amizade, incentivo e reflexões e aos demais colegas da Faculdade de Nutrição, Sueli, Natividade, Tânia, Gercílio, Débora, Walkiria, Sílvia e Luzia pelos incentivos. Muito obrigado a todos vocês!

Agradeço ainda à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Goiás, pela bolsa de formação concedida, e à Universidade Federal de Goiás, pela infraestrutura disponibilizada.

Ao chegar no final dessa jornada, vejo como passou rápido e como alguns momentos pareciam eternos. O processo de pesquisa apontou-me muitas das minhas limitações, mas principalmente, mostrou-me a capacidade de superá-las e isso foi gratificante. Credito todo esse aprendizado a quem é o autor de todos os caminhos e que, com amor sublime, sustenta-me a cada dia. Muito obrigado meu Deus!

*“É que ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhando, sem
aprender a refazer, a retocar o sonho por causa do
qual a gente se pôs a caminhar.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

A catequina e a epicatequina são compostos fenólicos da classe dos flavanóis, que atuam como antioxidantes e estão presentes em sementes de frutas, como o cacau e a maçã, nas folhas de chás e em certas castanhas e leguminosas. Os métodos espectrofotométricos existentes para analisar catequina e epicatequina são sujeitos a interferências e têm baixa seletividade, o que torna necessário purificar e derivatizar essas substâncias antes de quantificá-las. A catequina e a epicatequina, por serem *o*-difenois, podem ser derivatizadas oxidando-as com a enzima tirosinase, que catalisa a conversão de *o*-difenois em *o*-quinonas. Este trabalho teve o propósito de desenvolver um método enzimático espectrofotométrico, para determinação conjunta de catequina e epicatequina em alimentos, com base na derivatização oxidativa dessas substâncias, pela tirosinase. Foram utilizadas sementes de cacau (*Theobroma cacao*) como matriz, durante o desenvolvimento. O método foi avaliado, por meio de validação analítica e aplicado, também, para analisar o conteúdo de catequina e epicatequina em maçãs com cascas (*Malus domestica*), pó de sementes de guaraná (*Paullinia cupana*) e folhas secas de camélia (*Camellia sinensis*), em sachês, utilizados para o preparo de chás (branco, preto e verde). O método foi seletivo e teve precisão elevada, com coeficientes de variação inferiores a 4%. A exatidão variou entre 84,3% e 90,7%. Os teores totais de catequina e epicatequina, encontrados nas sementes de cacau e no guaraná em pó, foram próximos a dados da literatura. O método não foi adequado para a análise nas maçãs e folhas de chás, nas quais os teores totais de catequina e epicatequina foram menores que o limite de quantificação (1,61 mg g⁻¹ base seca). O método desenvolvido é aplicável, com exatidão razoável, em amostras contendo teores totais catequina e epicatequina acima do limite de quantificação. Nessa condição, a seletividade, a linearidade e a precisão atendem aos critérios de aceitação do método.

Palavras-chave: catequina, epicatequina, espectrofotometria, método, tirosinase

DEVELOPMENT OF ENZYMATIC-SPECTROPHOTOMETRIC METHODOLOGY BASED ON TYROSINASE FOR QUANTIFICATION OF CATECHIN AND EPICATECHIN IN FOODS

ABSTRACT

Catechin and epicatechin are phenolic compounds of the flavanols class, acting as antioxidants and present in seeds of fruits, like cocoa and apples, in tea leaves and in certain nuts and legumes. The current spectrophotometric methods for catechin and epicatechin analysis are prone to interferences and have low selectivity, requiring to purify and derivatize them before their quantification. Catechin and epicatechin, as *o*-diphenols, may be derivatized oxidizing them with the tyrosinase enzyme, that catalyzes the conversion of *o*-diphenols to *o*-quinones. This work had the purpose of developing an enzymatic spectrophotometric method, to determine total catechin and epicatechin in foods, based on the oxidative derivatization of these substances, by tyrosinase. Seeds of cocoa (*Theobroma cacao*) were used as the matrix, during the development. The method was evaluated, by analytical validation and was, also, applied to analyze the catechin and epicatechin content in apples with peels (*Malus domestica*), powdered guarana seeds (*Paullinia cupana*) and camellia's dried leaves (*Camellia sinensis*) in sachets, used for the preparation of teas (white, black and green). The method was selective and had high precision, with coefficients of variation below 4%. The accuracy ranged from 84.3% to 90.7%. Total catechin and epicatechin contents, found in the cocoa seeds and guarana powder, approached to the literature data. The method was not adequate to the analysis in apples and in tea leaves, whose total catechin and epicatechin contents were lower than the limit of quantification (1.61 mg g⁻¹ dried basis). The developed method is applicable, with reasonable accuracy, to samples with total catechin and epicatechin contents higher than the limit of quantification. In this condition, selectivity, linearity and precision meet the method's acceptance criteria.

Keywords: catechin, epicatechin, spectrophotometry, method, tyrosinase

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1.** Exemplos de fenóis simples presentes em alimentos. Teores apresentados para os alimentos com maior conteúdo de cada composto. Fonte: banco de dados Phenol Explorer (Neveu et al., 2010). 19
- Figura 1.2.** Exemplos de polifenóis presentes em alimentos. Teores apresentados para os alimentos com maior conteúdo de cada composto. Fonte: banco de dados Phenol Explorer (Neveu et al., 2010). 19
- Figura 1.3.** Estrutura básica dos flavonoides, com destaque para a cadeia carbônica principal, do tipo C₆-C₃-C₆. Adaptado de Crozier, Jaganath e Clifford (2009). 21
- Figura 1.4.** Classes de flavonoides presentes nos alimentos. Adaptado de Crozier, Jaganath e Clifford (2009). 21
- Figura 1.5.** Estrutura básica da classe dos flavanóis. Adaptado de Tsao (2010). 22
- Figura 1.6.** Estruturas de compostos fenólicos da classe dos flavanóis. Fonte: banco de dados Phenol Explorer (Neveu et al., 2010). 22
- Figura 1.7.** Taninos condensados (proantocianidinas) são polímeros de flavanóis. Adaptado de Tsao (2010). 23
- Figura 1.8.** Sítio ativo das enzimas contendo cobre, do tipo 3. Adaptado de Kaintz, Mauracher e Rompel (2014). 28
- Figura 1.9.** Classificação estrutural das polifenol oxidases e lacases. Adaptado de Pretzler, Bijelic e Rompel (2015). 29

Figura 1.10. Reação de hidroxilação (atividade monofenolase ou cresolase, EC 1.14.18.1) realizada apenas pelas tirosinases. Adaptado de Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).	29
Figura 1.11. Reação de oxidação (atividade difenolase ou catecolase, EC 1.10.3.1) realizada pelas tirosinases e pelas catecol oxidases. Adaptado de Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).....	30
Figura 1.12. Reação de oxidação de p-difenóis (atividade difenolase, EC 1.10.3.2) realizada pelas lacases. Adaptado de López-Nicolás e García-Carmona (2010).....	30
Figura 1.13. Estrutura molecular da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> . Imagem criada com o software Discovery Studio Visualizer (DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA, 2015) a partir do arquivo PDB ID 2Y9W, depositado por Ismaya et al. (2011) no banco de dados Protein Data Bank (Rose et al., 2015).	31
Figura 1.14. Mecanismos das reações catalisadas pela tirosinase. Adaptado de Itoh e Fukuzumi (2007), Kanteev, Goldfeder e Fishman (2015) e Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).	32

Capítulo 2

Figura 2.1. Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado para a atividade difenolase da tirosinase em função do pH e da temperatura. Ponto ótimo: pH = 6,2, temperatura = 38,0 °C, Atividade = 5217 unidades mL ⁻¹ de tirosinase (43,3 µg mL ⁻¹). Volume tirosinase: 0,1 mL.....	62
Figura 2.2. Espectros de absorção para os produtos da reação da catequina e da epicatequina com a tirosinase. Condições: 1,0 mL dos padrões (0,15 – 0,9 mM), 1,9 mL de tampão pH 6,2 e 0,1 mL tirosinase (43,3 µg mL ⁻¹), tempo de reação: 40 min, temperatura: 38,0 °C.....	63

- Figura 2.3.** Absorbâncias dos produtos de oxidação de soluções de catequina pela tirosinase. Condições: 1,9 mL de tampão fosfato pH 6,2; 1,0 mL de solução de catequina ($0,15 - 0,90 \text{ mmol L}^{-1}$); 0,1 mL de solução de tirosinase ($43,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), temperatura de $38,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 63
- Figura 2.4.** Espectros de absorção dos extratos (bruto e purificado por EFS) de cacau, dissolvidos tampão pH 6,2, antes e depois da reação com 0,1 mL de tirosinase em 1,9 mL de solução tampão pH 6,2. Temperatura: $38,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Tempo: 40 min..... 64
- Figura 2.5.** Espectros de absorção dos extratos de cacau purificados por EFS, antes e depois da reação com tirosinase nas condições experimentais do método. Massa de amostra: $0,25 - 1,0 \text{ g}$ em 10 mL de extrato. Aliquota de extrato: $0,1 - 1,0 \text{ mL}$.. 65
- Figura 2.6.** Espectros de absorção dos extratos purificados por EFS, antes e depois da reação com tirosinase, para as amostras analisadas, nas condições experimentais do método. Massas de amostra: $0,25 \text{ g}$. Volume do extrato: $10,0 \text{ mL}$. Aliquota do extrato: $1,0 \text{ mL}$ 67

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.1.** Classificação de compostos fenólicos de acordo com o número de carbonos da cadeia principal.20
- Tabela 1.2.** Alimentos com maiores teores flavanóis totais, de acordo com o banco de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos sobre teores de flavonoides em alimentos.24
- Tabela 1.3.** Teores médios e máximos de flavanóis presentes em alimentos indexados no banco de dados Phenol Explorer.....25
- Tabela 1.4.** Exemplos de métodos analíticos que utilizam as enzimas lacase, peroxidase ou tirosinase para determinar compostos fenólicos, em alimentos ou em soluções. 34

Capítulo 2

- Tabela 2.1.** Delineamento composto central rotacional utilizado para determinar a temperatura e o pH ótimos para a atividade difenolase da tirosinase.58
- Tabela 2.2.** Exatidão do método para a análise de matrizes brancas de cacau fortificadas com padrões em três níveis de concentração.66
- Tabela 2.3.** Precisão do método, calculada com base nos coeficientes de variação dos teores de padrão recuperados nos ensaios.66
- Tabela 2.4.** Teores de catequina e epicatequina em amostras de cacau e guaraná obtidos pelo método desenvolvido em comparação com resultados da literatura.....68

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	15
1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Flavanóis: compostos fenólicos importantes nos alimentos – propriedades e métodos para análise	18
2.1.1	Definição e classificação de compostos fenólicos	18
2.1.2	A classe dos flavanóis: definições e estruturas	22
2.1.3	Ocorrência de flavanóis nos alimentos.....	23
2.1.4	Propriedades físico-químicas dos flavanóis	25
2.1.5	Métodos para análise de flavanóis em alimentos	27
2.2	Análise de catequina e epicatequina em alimentos por meio da oxidação com tirosinase.....	28
2.2.1	Oxidação enzimática de compostos fenólicos.....	28
2.2.2	Tirosinase: estrutura, mecanismos de reação e atividade enzimática	30
2.2.3	Métodos enzimáticos para análises de fenólicos em alimentos	33
2.2.4	Uso de tirosinase para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos	35
2.3	Fundamentação para o desenvolvimento do método analítico	36
2.3.1	Seleção de matrizes alimentares.....	36
2.3.2	Preparação de amostras	36
2.3.3	Extração dos analitos da amostra	37
2.3.4	Purificação dos extratos contendo os analitos	38
2.3.5	Quantificação dos analitos.....	39
2.3.6	Validação analítica	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos.....	44
	REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO 2.....	54
ARTIGO – Método espectrofotométrico seletivo, baseado em tirosinase, para quantificar catequina e epicatequina em guaraná em pó e sementes de cacau * .	55
ANEXO – Normas para publicação na revista Food Analytical Methods.....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre compostos fenólicos em alimentos tiveram crescimento acentuado nos últimos anos, principalmente, por causa dos benefícios atribuídos a muitas dessas substâncias para a saúde. Como consequência, o interesse em desenvolver métodos mais específicos, e que possam ser reproduzidos com exatidão, precisão e rapidez para a determinação de fenólicos assumiu posição de destaque na literatura dessa área (GIADA, 2013; HAMINIUK et al., 2012).

Os métodos espectrofotométricos, geralmente empregados para quantificação de fenólicos totais ou de determinadas classes desses compostos, estão sujeitos a interferências de outras substâncias ou a limitações quanto à extração e purificação dos extratos. Por outro lado, a quantificação de fenólicos individuais é baseada, principalmente, em métodos cromatográficos que são realizados em equipamentos específicos e necessitam de consumíveis de alto custo e pessoal qualificado (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Uma abordagem que pode ser empregada para a análise de compostos fenólicos é utilizar enzimas capazes de oxidá-los (ARCIULI et al., 2013; ŞAHIN; DEMIR; MALYER, 2011; STEVANATO; FABRIS; MOMO, 2004). A quantificação, nesse caso, pode ser feita medindo-se os produtos formados ou o consumo de reagentes durante o processo de oxidação (GARCÍA-MOLINA et al., 2007).

A utilização de enzimas permite a detecção seletiva das substâncias analisadas, em virtude da seletividade enzimática em relação aos substratos (KORKUT; ERHAN; YILMAZ, 2011). No entanto, o uso de enzimas óxido-redutoras em solução, para analisar fenólicos totais ou individuais em alimentos, ainda é pouco investigado. Essa estratégia pode ser alternativa a determinados métodos espectrofotométricos que são pouco seletivos.

Dentre as enzimas que oxidam fenólicos, destacam-se as polifenol oxidases (tirosinases e catecol oxidases), as lacases e as peroxidases. O escopo de aplicação dessas enzimas depende das suas especificidades em relação aos substratos, bem como da estabilidade dos produtos de oxidação formados (ARAPOGLOU; LABROPOULOS; VARZAKAS, 2010).

A tirosinase é capaz de oxidar, as catequinas e epicatequinas (CORZO-MARTÍNEZ et al., 2012), que são substâncias da classe dos flavanóis, com elevada capacidade antioxidante (QUIDEAU et al., 2011), encontradas no cacau e seus derivados, em chás e em menor extensão em outras frutas, hortaliças e castanhas (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2014).

Os métodos espectrofotométricos tradicionais para analisar flavanóis (método da vanilina e método DMACA – dimetilamina-cinamaldeído) são limitados pela baixa reatividade da vanilina com flavanóis monoméricos, como a catequina e a epicatequina, e pela baixa estabilidade dos produtos coloridos, no método DMACA, o que prejudica a detecção espectrofotométrica desses compostos (HÜMMER; SCHREIER, 2008).

O desenvolvimento de um método espectrofotométrico mais seletivo para análise de catequina e epicatequina pode contribuir para a obtenção de resultados mais exatos e precisos, no entanto, faz-se necessário investigar a estabilidade dos produtos de oxidação dessas substâncias, as condições ótimas de pH, temperatura, o tempo de reação e o comprimento de onda para detectar os produtos. O propósito deste trabalho foi investigar o uso de tirosinase em solução, no desenvolvimento um método enzimático-espectrofotométrico seletivo para quantificar catequina e epicatequina em alimentos selecionados, contendo flavanóis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Flavanóis: compostos fenólicos importantes nos alimentos – propriedades e métodos para análise

2.1.1 Definição e classificação de compostos fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático substituído com hidroxila (GIADA, 2013). Essa definição compreende os fenóis simples, que possuem apenas um anel fenólico, e os polifenóis, que possuem várias hidroxilas ligadas a anéis aromáticos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

O termo polifenóis é, frequentemente, usado como sinônimo de compostos fenólicos, entretanto, esse termo deveria ser restrito a moléculas contendo, pelo menos, dois anéis aromáticos (CHEYNIER, 2012). De acordo com Quideau et al. (2011), a definição mais precisa para polifenóis, baseada na origem metabólica desses compostos é a seguinte:

O termo "polifenóis" deve ser usado para definir metabólitos secundários vegetais que são oriundos exclusivamente da via dos fenilpropanóides derivados do chiquimato e/ou da via dos policetídeos, que possuem mais de um anel fenólico e que são isentos de qualquer grupo funcional baseado em nitrogênio em suas expressões estruturais mais básicas.

Esta definição exclui as estruturas com, apenas, um anel aromático, que devem ser classificadas no grupo dos fenóis simples (Figura 1.1). A classe dos fenóis simples continua ocupando uma posição importante na pesquisa de compostos fenólicos mas, por definição, não deve ser confundida com a dos polifenóis (QUIDEAU et al., 2011; QUIDEAU, 2013).

Além da classificação em fenóis simples ou polifenóis (Figura 1.2), os compostos fenólicos são agrupados, de acordo com a estrutura da cadeia principal da molécula (Tabela 1.1) (AJILA et al., 2011). Conforme essa classificação, os fenóis simples e as benzoquinonas estão no grupo C_6 , os derivados de ácidos hidroxicinâmicos, no C_6-C_3 , as xantonas, estilbenos e flavanóides no $C_6-C_3-C_6$ e as lignanas e neolignanas pertencem ao grupo $(C_6-C_3)_2$. O grupo $(C_6-C_3-C_6)_n$ representa as proantocianidinas (taninos condensados) (PRIGENT, 2005).

Os compostos fenólicos podem ser classificados, também, quanto à sua distribuição na natureza, em compostos pouco distribuídos ou amplamente distribuídos ou ainda, quanto à sua localização nas células vegetais em solúveis (livres na fração solúvel) e insolúveis (ligados aos componentes das paredes celulares) (GIADA, 2013).

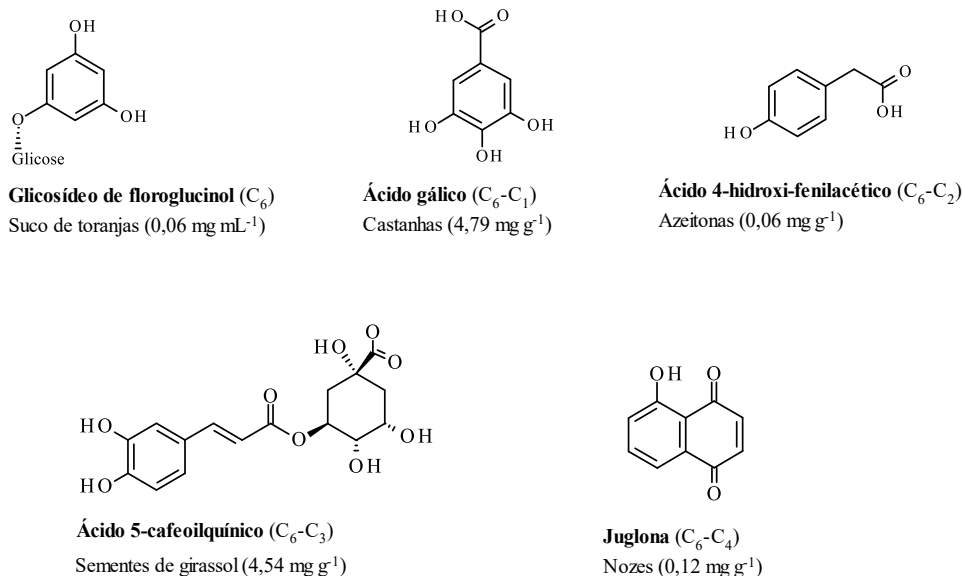


Figura 1.1. Exemplos de fenóis simples² presentes em alimentos. Teores apresentados para os alimentos com maior conteúdo de cada composto. Fonte: banco de dados Phenol Explorer³ (NEVEU et al., 2010).

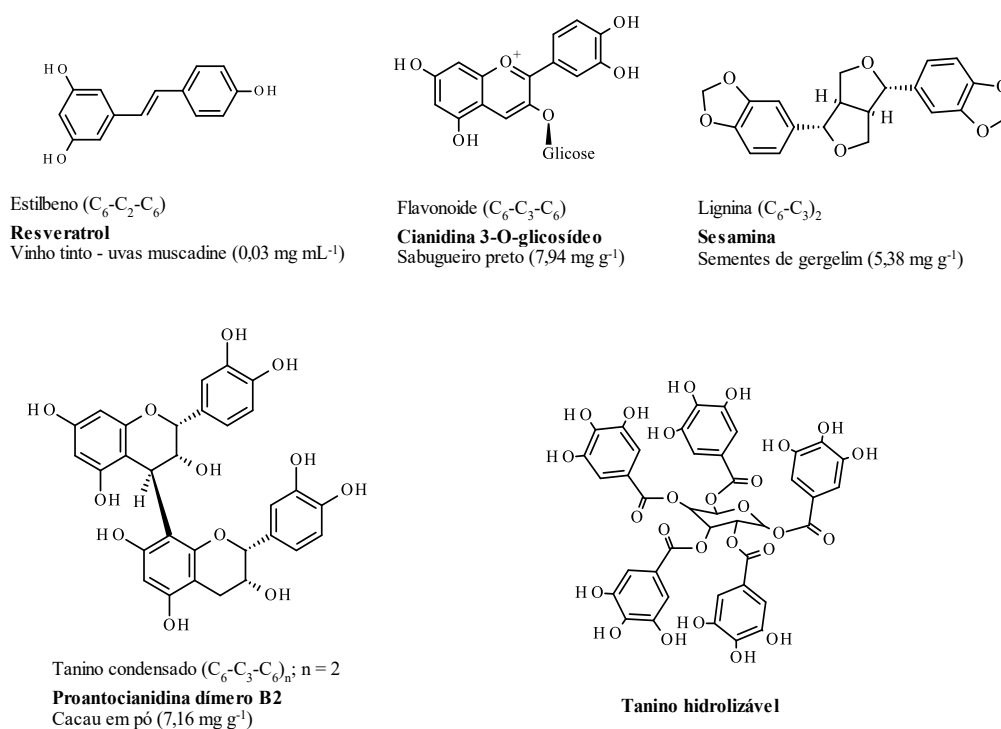


Figura 1.2. Exemplos de polifenóis presentes em alimentos. Teores apresentados para os alimentos com maior conteúdo de cada composto. Fonte: banco de dados Phenol Explorer (NEVEU et al., 2010).

² As estruturas químicas deste trabalho foram desenhadas, pelo autor, utilizando o software Accelrys Draw 4.2.

³ <http://phenol-explorer.eu/>

Tabela 1.1. Classificação de compostos fenólicos de acordo com o número de carbonos da cadeia principal.

Grupo	Unidades	Carbonos (cadeia principal)	Estrutura (cadeia principal)	Categoria	Exemplos de ocorrência
Fenóis simples	Monômeros	6	C ₆	Fenóis, benzoquinonas,	Cacau, café
		7	C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzóicos	Oxicoco, cereais
		8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas ácidos fenilacéticos	Maçã, banana, couve-flor
		9	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides	Cenoura, frutas cítricas, tomate, espinafre, pêssegos, cereais, peras, berinjela
		10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	Castanhas
Polifenóis		13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	Manga, mangostão
		14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	Uvas
		15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides, isoflavonoides	Amplamente distribuídos
	Dímeros	18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanais, neolignanais	Gergelim, centeio, trigo, linhaça
		30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Pouco comuns
	Polímeros	k	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas	Amplamente distribuídos
			(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Proantocianidinas (taninos condensados)	Amplamente distribuídos
			Complexa	Taninos hidrolisáveis	Romãs, framboesas

Fonte: Ajila et al. (2011), Andrés-Lacueva et al. (2010) e Prigent (2005).

Os flavonoides são compostos fenólicos constituídos por 15 átomos de carbono, com dois anéis aromáticos (A e B), ligados por um anel heterocíclico contendo três átomos de carbono e um átomo de oxigênio, formando um esqueleto básico do tipo C₆-C₃-C₆ (Figura 1.3) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). O nome dessa categoria deriva da palavra grega

'*flavus*', que significa 'amarelo', indicando que muitos desses compostos são pigmentos vegetais com essa cor (MIRANDA; MAIER; STEVENS, 2012).

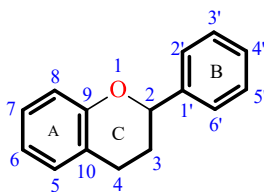


Figura 1.3. Estrutura básica dos flavonoides, com destaque para a cadeia carbônica principal, do tipo C₆-C₃-C₆. Adaptado de Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

Existem aproximadamente 9000 flavonoides conhecidos, o que os torna nos compostos fenólicos majoritários em alimentos (MIRANDA; MAIER; STEVENS, 2012). Os flavonoides correspondem a, aproximadamente, dois terços dos fenólicos identificados nos alimentos (HAMINIUK et al., 2012), seguidos pela categoria dos ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos), que representam, aproximadamente, 30% do total de fenólicos dos alimentos (GARCIA-SALAS et al., 2010).

Os flavonoides são agrupados em diferentes classes de acordo com o nível de oxidação do anel “C” (Figura 1.4). As classes majoritárias de flavonoides nos alimentos são: flavonóis, flavonas, flavanóis (catequinas), antocianinas, flavanonas e isoflavonas, outras classes minoritárias são: dihidroflavonóis, flavan-3,4-dióis, chalconas, dihidrochalconas e auronas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

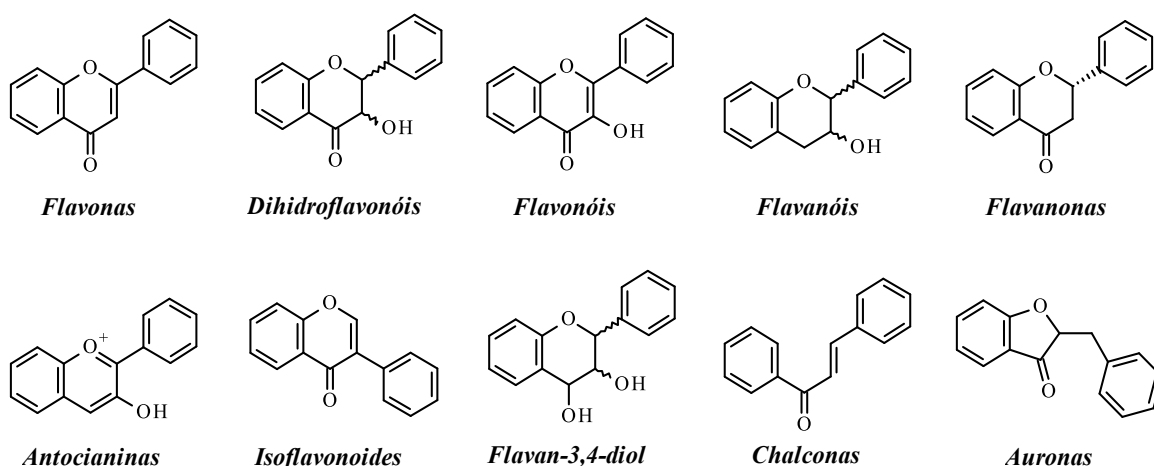


Figura 1.4. Classes de flavonoides presentes nos alimentos. Adaptado de Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

2.1.2 A classe dos flavanóis: definições e estruturas

Na categoria dos flavonoides destaca-se a classe dos flavanóis ou flavan-3-óis, também chamados de catequinas. Essa classe distingue-se dos demais flavonoides por não possuir ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e carbonila no carbono 4 (Figura 1.5), além de serem hidroxilados nos carbonos 3, 3' e 4' (TSAO, 2010).

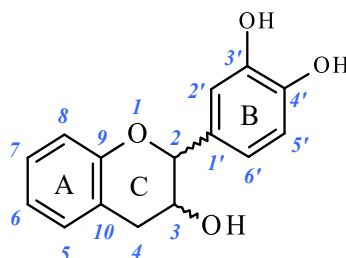


Figura 1.5. Estrutura básica da classe dos flavanóis. Adaptado de Tsao (2010).

Os flavanóis possuem dois centros quirais (nos carbonos 2 e 3), dessa forma, há quatro possíveis diastereoisômeros, ou seja, ($\pm$)-catequina, com configuração *cis*, e ($\pm$)-epicatequina, com configuração *trans* (TSAO, 2010). A catequina e a epicatequina podem ser hidroxiladas no carbono 5', para formar galocatequinas e epigalocatequinas ou ser esterificada com o ácido gálico no carbono 4, formando galatos de catequina e de epigalocatequina (Figura 1.6) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

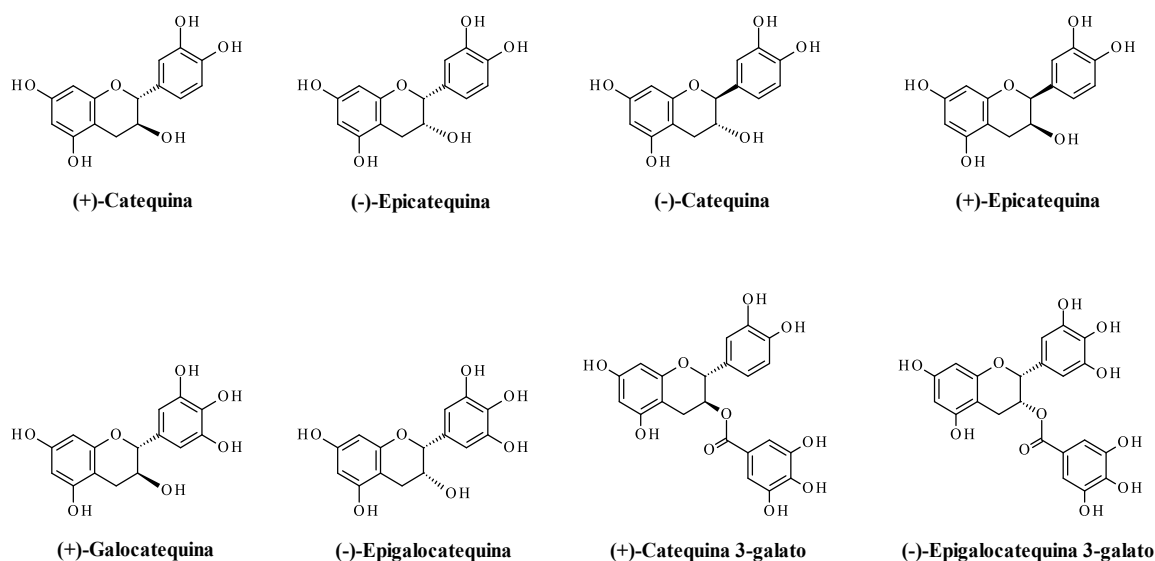


Figura 1.6. Estruturas de compostos fenólicos da classe dos flavanóis. Fonte: banco de dados Phenol Explorer (NEVEU et al., 2010).

Os flavanóis podem ter duas ou três hidroxilas no anel B. A estrutura com duas hidroxilas adjacentes nesse anel é do tipo *o*-difênol, também chamada de estrutura catecólica. Estruturas com três hidroxilas são do tipo pirogálica. Os flavanóis podem ter uma unidade galoil ligada no grupo 3-hidroxi do anel C ou condensar entre si, por meio de ligações entre o carbono 4 de uma molécula e o carbono 8 da outra para formar os taninos condensados ou proantocianidinas (Figura 1.7) (QUIDEAU et al., 2011).

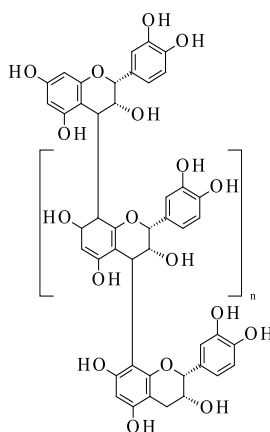


Figura 1.7. Taninos condensados (proantocianidinas) são polímeros de flavanóis. Adaptado de Tsao (2010).

2.1.3 Ocorrência de flavanóis nos alimentos

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) publica e revisa, frequentemente, um banco de dados oficial sobre o conteúdo de flavonoides em alimentos. A versão mais recente do banco de dados (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2014) contém informações de 308 artigos sobre os teores de flavonoides em 502 alimentos. Um levantamento neste banco de dados indica que os flavanóis são encontrados, principalmente, no cacau e seus derivados, nos chás, em frutas e em determinados legumes e hortaliças, sendo que as sementes de cacau, o chá verde, o chocolate em pó sem açúcar e a farinha de sementes de alfarrobas são as principais fontes desses compostos (Tabela 1.2).

Os dados publicados pelo USDA indicam, ainda, que os flavanóis mais comuns nos alimentos são, nesta ordem: (-)-epicatequina, encontrada em 116 alimentos indexados; (+)-catequina (111 alimentos); (-)-epigallocatequina (56 alimentos); (-)-epigallocatequina 3-galato (39 alimentos); (-)-epicatequina 3-galato (34 alimentos) e (+)-galocatequina (20 alimentos) (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2014).

Tabela 1.2. Alimentos com maiores teores flavanóis totais, de acordo com o banco de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos sobre teores de flavonoides em alimentos.

Grupo	Alimento	Flavanóis totais (mg g ⁻¹ b.u. ou mg mL ⁻¹)	
		Média	Variação
Cacau e derivados	Sementes de cacau	86,06	—
	Chocolate em pó, sem açúcar	2,61	(2,19 – 3,48)
	Chocolate para confeitaria, sem açúcar	2,06	(0,92 – 3,18)
	Chocolate preto	1,62	(1,06 – 2,29)
	Chocolate em pó, sem açúcar, processado com álcali	0,93	(0,41 – 1,01)
Bebidas	Chá verde, Quingmao, folhas grandes, infusão	3,24	(3,15 – 3,33)
	Chá verde, infusão	1,32	(0,96 – 5,10)
	Chá preto, infusão	1,14	(0,52 – 2,61)
	Chá branco, infusão	0,69	(0,64 – 0,75)
	Chá verde descafeinado, infusão	0,65	(0,58 – 0,71)
	Chá preto descafeinado, infusão	0,53	(0,48 – 0,61)
	Chá verde saborizado, infusão	0,51	(0,28 – 0,85)
	Chá oolong, infusão	0,49	(0,11 – 0,10)
Frutas	Sementes de uva	1,68	(0,29 – 5,28)
	Mirtilo (Blueberries - rabbiteye)	1,24	(0,15 – 5,17)
	Amoras silvestres	0,43	(0,0 – 3,39)
	Casca de maçãs	0,36	(0,08 – 0,72)
	Ameixas pretas com casca	0,34	(0,12 – 0,55)
	Oxicocos (Cranberry)	0,32	—
	Uvas pretas	0,22	(0,20 – 0,22)
	Pêssegos	0,16	(0,69 – 0,27)
	Suco de cereja ácida	0,16	(0,20 – 0,42)
	Maçã Red Delicious, com casca	0,12	(0,01 – 0,21)
Leguminosas	Farinha de alfarrobas	1,90	—
	Favas (<i>Vicia faba</i>), sementes verdes	0,63	(0,49 – 0,81)
Castanhas	Noguera-pecã	0,16	(0,05 – 0,27)
	Pistache	0,07	(0,0 – 0,18)

Fonte: Compilado a partir da soma dos teores de flavanóis individuais para os alimentos indexados no banco de dados do USDA sobre o conteúdo de flavonoides em alimentos (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2014).

A (-)-catequina e a (+)-epicatequina praticamente não são encontrados nos alimentos (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2014), fazendo com que, em pesquisas da área, os termos catequina e epicatequina sejam usados sem distinguir os isômeros mais comuns dos mais raros de cada composto (CHIN et al., 2013).

O banco de dados Phenol Explorer (NEVEU et al., 2010) é outra fonte importante de informações sobre o teor de compostos fenólicos em alimentos. De acordo com este banco de dados, a (-)-epicatequina e a (+)-catequina são os principais flavanóis presentes nos alimentos, sendo identificados em mais de 70 dos alimentos catalogados, com teores médios em torno de 0,05 mg g⁻¹ *b.u.* nesses alimentos e conteúdos máximos, identificados em amostras de cacau em pó, de 1,58 mg g⁻¹ *b.u.* para epicatequina e 1,08 mg g⁻¹ *b.u.* para catequina (Tabela 1.3).

Tabela 1.3. Teores médios e máximos de flavanóis presentes em alimentos indexados no banco de dados Phenol Explorer

Flavanol	Teor (mg g ⁻¹ <i>b.u.</i>)		N
	Média	Máximo	
(-)-Epicatequina	0,06 ± 0,21	1,58	74
(+)-Catequina	0,04 ± 0,13	1,08	81
(-)-Epigallocatequina	0,04 ± 0,06	0,20	25
(-)-Epigallocatequina-3-galato	0,07 ± 0,09	0,27	11
(-)-Epicatequina-3-galato	0,02 ± 0,03	0,09	20
(+)-Galocatequina	0,02 ± 0,04	0,14	18

Fonte: Consultas realizadas no banco de dados Phenol Explorer, versão 3.6, em julho de 2015. N: Número de alimentos distintos que compõem a média.

2.1.4 Propriedades físico-químicas dos flavanóis

As propriedades físico-químicas dos flavanóis, como a polaridade e a solubilidade intermediárias, as elevadas capacidades antioxidantes, as baixas estabilidades oxidativas e a absorção de luz ultravioleta são determinadas pela estrutura básica desses compostos, constituída por anéis aromáticos ligados a hidroxilas e pela presença de outros grupos ligados à cadeia principal (LATTANZIO; CARDINALI; LINSALATA, 2012; QUIDEAU et al., 2011).

Os flavanóis são compostos de polaridade intermediária. Isso ocorre por causa das interações hidrofóbicas (interações de Van der Waals) nos anéis aromáticos e interações hidrofílicas (ligações de hidrogênio), nas hidroxilas, conferindo-lhes a natureza anfifílica (QUIDEAU, 2013). Por causa das polaridades intermediárias, os flavanóis são mais solúveis em misturas constituídas de solventes orgânicos e água, que têm polaridades semelhantes (VUONG et al., 2010).

Outro fator que altera a solubilidade é a presença de grupos ligados à molécula. Compostos fenólicos glicosilados com açúcares como glicose, galactose e arabinose têm alta solubilidade em água por causa do maior número de hidroxilas (LATTANZIO et al., 2008). Os flavanóis, geralmente, não são glicosilados, diferindo de outras classes de compostos fenólicos (KIM; LEE, 2005).

Os flavanóis são bons agentes redutores. Isso ocorre por causa da presença, de anéis aromáticos com elétrons deslocalizados, o que possibilita a estabilização de radicais livres gerados nos processos de transferência de elétrons e de hidrogênio. Essa propriedade confere aos flavanóis uma elevada atividade antioxidante. A atividade antioxidante é potencializada, nesses compostos, pela presença de pelo menos duas hidroxilas no anel B. Esse é o fator que mais influencia a atividade antioxidante entre os flavonoides. Os flavanóis com três hidroxilas no anel B ou uma unidade galoil ligada no grupo 3-hidroxi do anel C são antioxidantes com atividade similar ou superior à do flavonol quercetina, um dos compostos de maior atividade antioxidante (QUIDEAU et al., 2011).

Os flavanóis possuem baixa estabilidade oxidativa, e a exposição à luz, a altas temperaturas e a ambientes alcalinos podem levar à oxidação desses compostos (GADKARI; BALARAMAN, 2015). A oxidação pode ocorrer espontaneamente (autooxidação) ou ser promovida por enzimas oxirredutoras (oxidação enzimática) (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Os flavanóis são incolores, visto que as absorbâncias máximas desses compostos estão na região ultravioleta do espectro, em 280 nm. Estes comprimentos de onda de absorção são próximos aos de outros compostos fenólicos, como os fenóis simples e ácidos fenólicos (entre 250 e 290 nm) os derivados do ácido cinâmico (entre 290 e 300 nm) as flavonas e flavonóis (em 250 e 350 nm) e as chalconas e auronas (em 250 e 350 nm) (LATTANZIO et al., 2008).

É importante conhecer os comprimentos de onda de absorção dos flavanóis e dos outros compostos fenólicos, uma vez que essa é uma das propriedades em que se baseiam os métodos cromatográficos, com detectores de luz ultravioleta e visível (UV/Vis), e os métodos espectrofotométricos, que são empregados para detectar esses compostos.

2.1.5 Métodos para análise de flavanóis em alimentos

A cromatografia líquida é a técnica mais utilizada para análise de flavanóis. Os detectores de luz UV/Vis são os mais amplamente usados nessa técnica (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Detectores mais modernos, baseados na medição da massa das moléculas permitem a identificação simultânea de diversos compostos, sem a necessidade de padrões externos para comparação (TRIBALDO, 2015). Os métodos cromatográficos requerem equipamentos sofisticados, o que os torna pouco acessíveis à maioria dos laboratórios.

Métodos espectrofotométricos, mais práticos, estão disponíveis para a análise de flavanóis. Entretanto, como, nesses métodos, não há separação entre os compostos analisados, eles são limitados pela sobreposição com os espectros de outros compostos presentes na amostra (CHEYNIER, 2012). A quantificação de compostos individuais, ou de determinada classe, por essa técnica, requer purificá-los previamente, ou derivatizá-los, ou seja, reagir-los com outras substâncias e detectar os produtos formados (WEBER; SCHULZE-KAYSERS; SCHIEBER, 2014).

Os métodos espectrofotométricos, disponíveis para análise de flavanóis, baseiam-se na derivatização desses compostos, com vanilina ou com o reagente DMACA (4-dimetilaminacinaldeído), para formar complexos vermelho ou verde, com absorbâncias máximas em 500 nm e 640 nm, respectivamente (LORRAIN et al., 2013).

O método da vanilina é limitado pela interferência com as antocianinas, que absorvem em torno de 500 nm (HÜMMER; SCHREIER, 2008), e possui baixa sensibilidade para os flavanóis monoméricos, sendo mais sensível para detectar seus polímeros (taninos condensados) (NACZK; SHAHIDI, 2004).

O método DMACA é mais sensível que o da vanilina e é menos suscetível à interferência com as antocianinas, mas o produto colorido da reação é instável. A principal limitação dos métodos da vanilina e DMACA, para a análise de flavanóis, é a interferência com os taninos condensados (HÜMMER; SCHREIER, 2008).

Os métodos espectrofotométricos são práticos para a determinação conjunta de flavanóis, entretanto, a interferência com outros compostos limita a aplicação desses métodos. O desenvolvimento de um método espectrofotométrico alternativo, para a análise de compostos dessa classe, requer a aplicação de estratégias para minimizar a interferência com outros compostos.

2.2 Análise de catequina e epicatequina em alimentos por meio da oxidação com tirosinase

As interferências nas análises de flavanóis, por espectrofotometria, podem ser minimizadas, aplicando métodos mais seletivos para detectar esses compostos. Uma abordagem, que pode ser empregada é utilizar enzimas, capazes de oxidar os flavanóis para derivatizar esses compostos, e detectar, seletivamente, os produtos de oxidação formados.

2.2.1 Oxidação enzimática de compostos fenólicos

Determinadas enzimas da classe das óxido-redutases (EC. 1) atuam sobre substratos fenólicos. As peroxidases (EC 1.11.1.7) oxidam fenólicos, usando peróxido de hidrogênio como aceptor, as catecol-oxidases (EC. 1.10.3.1) e lacases (EC. 1.10.3.2) atuam sobre difenóis e usam oxigênio como aceptor de elétrons, as tirosinases (EC. 1.14.18.1) atuam sobre monofenóis e *orto*-difenóis, usando oxigênio como aceptor de elétrons (REHDER, 2015; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). O termo polifenol oxidase (PPO) designa as tirosinases e as catecol oxidases, bem como as lacases, em menor frequência. Muitos autores não distinguem as diferenças entre essas enzimas, em razão da sobreposição de suas especificidades em relação a alguns substratos (FACCIO, 2011).

As tirosinases e as catecol oxidases possuem uma característica estrutural em comum, que é a presença de dois átomos de cobre, no sítio catalítico. O sítio catalítico fixa-se ao oxigênio molecular para formar um complexo di-cobre (Figura 1.8). Enzimas com essa configuração são classificadas, quanto à estrutura, como metaloproteínas contendo cobre, do tipo 3 (Figura 1.9) (ITO; FUKUZUMI, 2007). Este grupo difere das metaloproteínas contendo cobre, dos tipos 1 e 2, que possuem apenas um átomo de cobre no sítio ativo e desempenham funções diferentes (FREIE UNIVERSITÄT BERLIN, 2015).

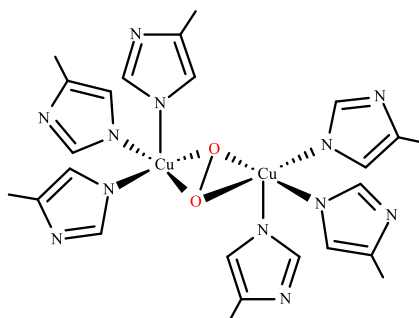


Figura 1.8. Sítio ativo das enzimas contendo cobre, do tipo 3. Adaptado de Kaintz, Mauracher e Rompel (2014).

As lacases contém quatro átomos de cobre, sendo um do tipo 1, um do tipo 2 e dois do tipo 3, que são acoplados por meio de um ligante em ponte (LÓPEZ-NICOLÁS; GARCÍA-CARMONA, 2010).

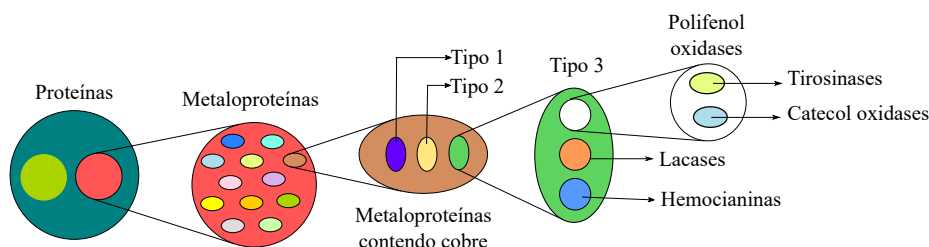


Figura 1.9. Classificação estrutural das polifenol oxidases e lacases. Adaptado de Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).

Embora apresentem semelhanças estruturais, as catecol oxidases, as tirosinases e as lacases diferem quanto às especificidades de seus substratos (CORZO-MARTÍNEZ et al., 2012). As tirosinases catalisam a *orto*-hidroxilação de monofenóis em *o*-difenois (atividade monofenol monoxigenase, EC 1.14.18.1) (Figura 1.10) e a oxidação de *o*-difenois para formar as *o*-quinonas correspondentes (Figura 1.11) (atividade difenolase ou catecol oxidase, EC 1.10.3.1), cada uma dessas etapas está acoplada à redução do oxigênio molecular para formar água (PRETZLER; BIJELIC; ROMPEL, 2015).

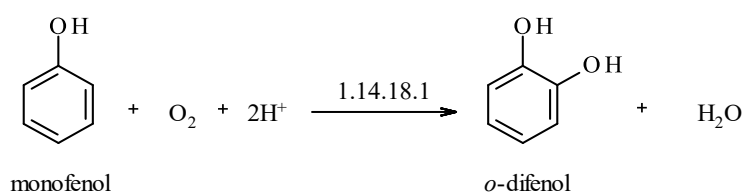


Figura 1.10. Reação de hidroxilação (atividade monofenolase ou cresolase, EC 1.14.18.1) realizada apenas pelas tirosinases. Adaptado de Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).

As catecol oxidases catalisam, apenas, a conversão de *o*-difenois em *o*-quinonas (REHDER, 2015). As tirosinases são as únicas enzimas contendo cobre conhecidas que realizam a reação de hidroxilação de monofenóis e a reação de oxidação de *o*-difenois (ISMAYA, 2011). Ambas as atividades também são chamadas de atividades cresolase e catecolase, respectivamente (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

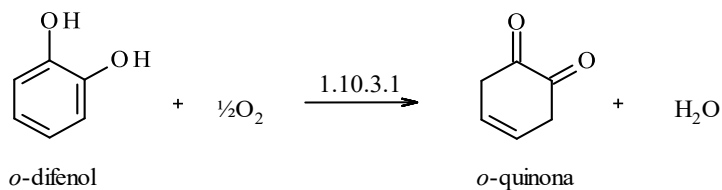


Figura 1.11. Reação de oxidação (atividade difenolase ou catecolase, EC 1.10.3.1) realizada pelas tirosinases e pelas catecol oxidases. Adaptado de Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).

As lacases não são específicas em relação aos substratos fenólicos. Essas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de várias substâncias orgânicas, incluindo os *para*-difênóis (Figura 1.12), aminofenóis, poliaminas, metoxifenóis, ligninas, aril-diaminas e alguns íons inorgânicos, com a redução simultânea do oxigênio para formar água (LÓPEZ-NICOLÁS; GARCÍA-CARMONA, 2010).

Diversos estudos têm confirmado que as propriedades do sítio catalítico são similares nas enzimas contendo cobre do tipo 3, sugerindo que as diferenças nas suas atividades sejam atribuídas aos vários arranjos espaciais das cadeias proteicas, que podem interferir na acessibilidade dos substratos de cada enzima ao sítio catalítico (KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015).

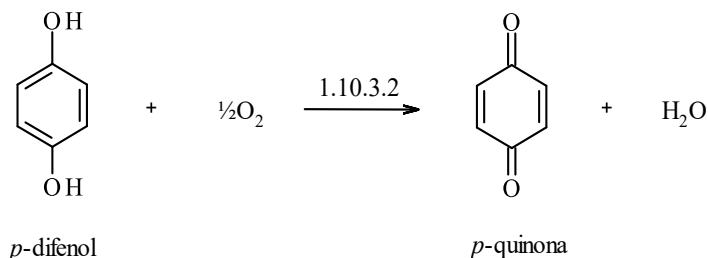


Figura 1.12. Reação de oxidação de *p*-difênóis (atividade difenolase, EC 1.10.3.2) realizada pelas lacases. Adaptado de López-Nicolás e García-Carmona (2010).

2.2.2 Tirosinase: estrutura, mecanismos de reação e atividade enzimática

As tirosinases têm encontrado muitas aplicações biotecnológicas, por causa da habilidade em oxidar pequenas moléculas fenólicas. Dentre essas aplicações, destacam-se a biorremediação, a produção de pigmentos, de biopolímeros com ligações cruzadas (KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015) e aplicações analíticas, para medir diversos derivados de fenóis e catecóis (BROWN; MALE; LUONG, 1994).

Nas últimas décadas, a tirosinase, obtida do cogumelo comum (*Agaricus bisporus*), surgiu como a tirosinase "padrão" em trabalhos científicos, principalmente, por causa da sua fácil disponibilidade comercial e preços relativamente baixos (PRETZLER; BIJELIC; ROMPEL, 2015). A tirosinase de *Agaricus bisporus* (Figura 1.13) é um heterotetrâmero com massa molecular de 120 kDa, constituído por duas subunidades (H1 e H2) de aproximadamente 43 kDa e duas subunidades (L1 e L2) de aproximadamente 14 kDa. Os sítios catalíticos localizam-se nas subunidades H, na parte interna de cavidades hidrofóbicas, localizadas em suas superfícies (MARIA-SOLANO et al., 2016).

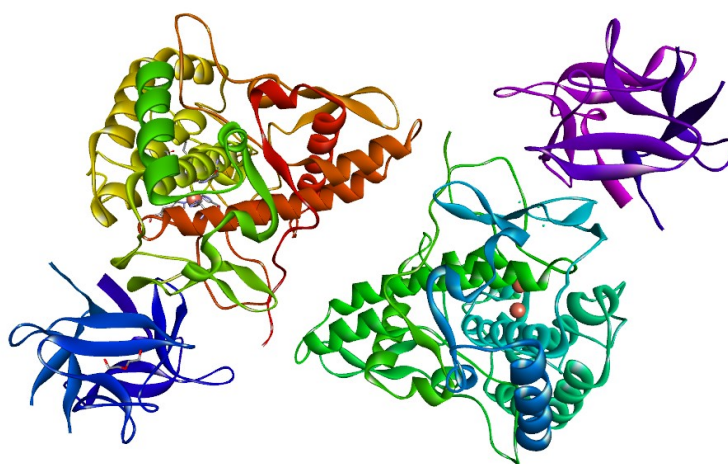


Figura 1.13. Estrutura molecular da tirosinase de *Agaricus bisporus*. Imagem criada com o software Discovery Studio Visualizer (DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA, 2015) a partir do arquivo PDB ID 2Y9W, depositado por Ismaya et al. (2011) no banco de dados Protein Data Bank (ROSE et al., 2015).

A tirosinase desempenha papel importante nos processos de melanogênese (formação de melanina) em mamíferos e de escurecimento enzimático em frutas ou fungos. Em ambos os processos a enzima é responsável pela etapa inicial de conversão de monofenóis em *o*-difenóis e de *o*-difenóis em *o*-quinonas (CHANG, 2009).

A tirosinase promove reações de oxidação em duas vias catalíticas. Na primeira via (Figura 1.14-A) os monofenóis são *orto*-hidroxilados (atividade monofenolase), produzindo *o*-difenóis. Na segunda via (Figura 1.14-B), que ocorre independentemente da primeira, *o*-difenóis são oxidados (atividade difenolase), produzindo as *o*-quinonas correspondentes (HOLLMANN et al., 2011).

Durante os ciclos catalíticos, a estrutura do sítio ativo da tirosinase altera-se em decorrência das reações de óxido-redução, promovidas pelos átomos de cobre, e a enzima pode

ser encontrada em quatro estados de oxidação diferentes (E_{deoxi} , E_{oxi} , E_{met} e E_{inat}), que possuem diferentes conformações (RAMSDEN; RILEY, 2014).

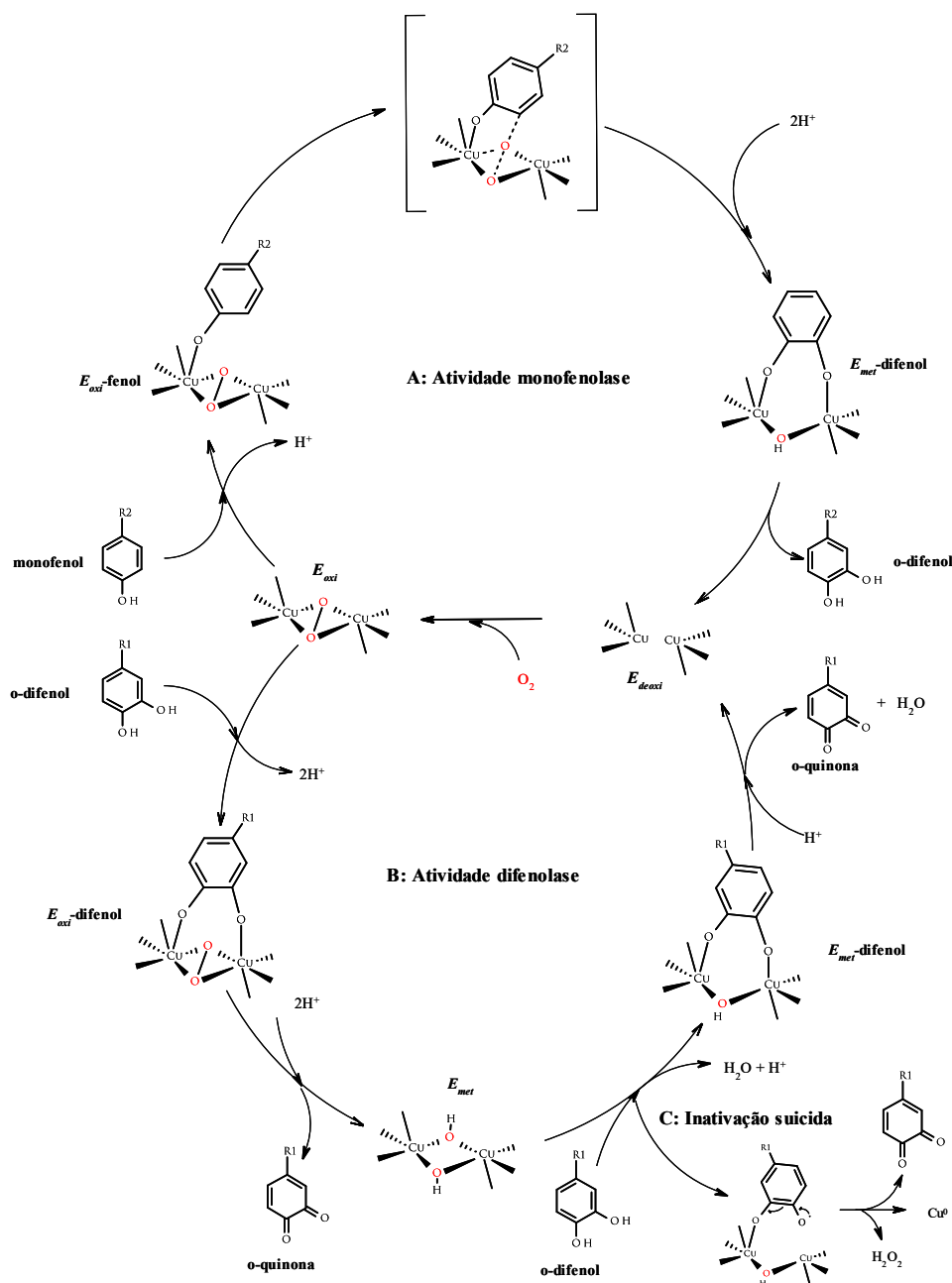


Figura 1.14. Mecanismos das reações catalisadas pela tirosinase. Adaptado de Itoh e Fukuzumi (2007), Kanteev, Goldfeder e Fishman (2015) e Pretzler, Bijelic e Rompel (2015).

A reação de o-hidroxilação (Figura 1.14-A) inicia-se com a ligação do oxigênio (O_2) à enzima. O substrato (monofenol) associa-se, formando o complexo E_{oxi} -monofenol. Subsequentemente, a posição *orto* do monofenol é hidroxilada por um átomo de oxigênio do

complexo para formar um *o*-difenoil, o qual, então, dissocia-se para liberando o *o*-difenoil e completando o ciclo (PRETZLER; BIJELIC; ROMPEL, 2015).

A reação de oxidação (desidrogenação) (Figura 1.14-B) também se inicia com a ligação do oxigênio ao sítio catalítico da enzima. Os átomos de cobre ligam-se aos oxigênios das hidroxilas do *o*-difenoil para formar o complexo E_{oxi} -difenoil. O difenoil é oxidado para formar uma *o*-quinona e a enzima é reduzida à forma E_{met} . Outra molécula de *o*-difenoil liga-se à enzima, sendo à *o*-quinona. A enzima é reduzida a E_{deoxi} , completando o ciclo. A oxidação de difenois pelo mecanismo oxidativo de monofenóis (Figura 1.14-C), resulta na redução do cobre (Cu^{2+}) a Cu^0 e desativação da tirosinase (inativação suicida) (KANTEEV; GOLDFEDER; FISHMAN, 2015).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a transformação de 1 μ mol do substrato por minuto (ARAPOGLOU; LABROPOULOS; VARZAKAS, 2010). A atividade difenolase da tirosinase é de 10 a 40 vezes maior que a atividade monofenolase (CORZO-MARTÍNEZ et al., 2012).

A especificidade de substratos da tirosinase varia de acordo com a fonte da enzima (CORZO-MARTÍNEZ et al., 2012). Em fungos e vertebrados, a tirosinase catalisa a etapa inicial de formação da melanina a partir da tirosina. Em plantas, seus substratos fisiológicos são uma variedade de compostos fenólicos (CHANG, 2009). Os substratos para a tirosinase de *Agaricus bisporus* incluem: L-tirosina, fenol, tiramina, L-DOPA (3,4-di-hidroxi-l-fenilalanina), ácido cafeico, catecol, ácido elágico, catequina e epicatequina (FACCIO, 2011).

2.2.3 Métodos enzimáticos para análises de fenólicos em alimentos

As tirosinases, as lacases e peroxidases têm sido aplicadas em novos métodos para análise de compostos fenólicos, individuais ou totais, principalmente, em amostras ambientais e de alimentos (KORKUT; ERHAN; YILMAZ, 2011; PREHN; GONZALO-RUIZ; CORTINA-PUIG, 2012). As enzimas são utilizadas, basicamente, de duas formas nesses métodos: imobilizadas (catálise heterogênea) ou em solução (catálise homogênea) e diferentes técnicas são utilizadas para detectar os produtos da reação (Tabela 1.4).

Os biossensores contendo enzimas imobilizadas (catálise heterogênea) são úteis, principalmente, nas análises ambientais, para detectar de forma prática, *in situ*, compostos fenólicos que atuam como poluentes (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015), entretanto, apesar de suas especificidades e sensibilidades, estes biossensores são de uso limitado, sendo considerados como dispositivos para detecções rápidas de fenólicos (AJILA et al., 2011).

Tabela 1.4. Exemplos de métodos analíticos que utilizam as enzimas lacase, peroxidase ou tirosinase para determinar compostos fenólicos, em alimentos ou em soluções.

Enzima	Forma de uso da enzima	Analito (s)	Técnica de detecção	Referência
Lacase	Imobilizada em eletrodo	Hidroquinona, em solução	Eletroquímica	(CASERO et al., 2013)
	Imobilizada em papel	L-DOPA, Catecol em solução	Colorimétrica	(OKTEM et al., 2012)
	Imobilizada em polímeros	Luteolina, em chás	Eletroquímica	(FRANZOI et al., 2009)
Peroxidase	Imobilizada em polímeros	Fenólicos totais, em <i>Prunella L.</i>	Espectrofotométrica	(ŞAHIN; DEMIR; MALYER, 2011)
	Imobilizada em nanotubos de carbono	Soluções de catecol, fenol, hidroquinona, resorcinol, e 4-clorofenol	Eletroquímica	(PEREIRA et al., 2009)
	Em solução	Fenólicos totais, em vinhos e chás	Espectrofotométrica	(STEVANATO; FABRIS; MOMO, 2004)
Tirosinase	Em solução	Fenólicos totais, em azeite de oliva	Espectrofotométrica	(MOSCA et al., 2000)
	Imobilizada em papel	Compostos fenólicos, em vinho	Colorimétrica	(ARCIULI et al., 2013)
	Imobilizada em polímeros	Fenólicos totais, em vinho	Eletroquímica	(KIM et al., 2010)

Fonte: Elaborado com base nas referências citadas na tabela

Métodos enzimático-espectrofotométricos foram desenvolvidos para quantificação de fenólicos totais em alimentos como uvas, vinhos, chás e azeite de oliva (HARKENSEE et al., 2006; MOSCA et al., 2000; STEVANATO; FABRIS; MOMO, 2004). Esses métodos baseiam-se na determinação de absorbância de produtos de oxidação, como as *o*-quinonas resultantes da reação enzimática (GARCÍA-MOLINA et al., 2007). Embora as enzimas utilizadas nesses estudos não sejam capazes de oxidar todos os compostos fenólicos, seus autores consideraram os métodos adequados para quantificar fenólicos totais.

Mosca et al. (2000) utilizaram tirosinase em solução com tampão fosfato e NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), como agente redutor, para determinar o teor de fenólicos totais em azeite de oliva. Esse estudo não considerou a especificidade da tirosinase para monofenóis ou *o*-difenois ao concluir que o método seria “válido e rápido para análise do

conteúdo de fenólicos totais em azeite de oliva”, por isso, uma avaliação mais criteriosa do método é importante.

Harkensee et al. (2006) propuseram a determinação de fenólicos totais em uvas e vinhos, após oxidá-los com tirosinase em solução. Os autores afirmaram que “todos os compostos fenólicos, presentes na amostra, poderiam ser quantificados pelo método”. Entretanto, os resultados sobre os teores dos compostos fenólicos determinados não são evidentes. Os autores do estudo observaram, apenas, uma “alta correlação entre os valores de absorbância, obtidos pelo método, e as concentrações obtidas pelo método de Folin-Ciocalteu”. A alta correlação esperada, nesse caso, deveria ser entre os valores de concentração obtidos por ambos os métodos.

No estudo de Stevanato, Fabris e Momo (2004), a peroxidase foi utilizada, em solução, para determinar o teor de fenólicos totais em chás e vinhos. Esse é um método enzimático-espectrofotométrico bem fundamentado, que teve resultados consistentes com os métodos de Folin-Ciocalteu, para fenólicos totais, e ressonância paramagnética eletrônica (EPR), para atividade antioxidante. Esse método foi considerado confiável para determinar fenólicos totais, por ser mais específico e menos suscetível a interferências de outras substâncias (MA; CHEUNG, 2007).

2.2.4 Uso de tirosinase para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos

Os métodos enzimático-espectrofotométricos, para quantificação de compostos fenólicos, encontrados na literatura, demonstram a viabilidade de uso dessa estratégia para análise. Entretanto, é importante observar a especificidade da enzima utilizada, ao delimitar suas possíveis aplicações. É incoerente generalizar o uso de enzimas óxido-redutoras, específicas para determinados compostos, para a determinação de fenólicos totais. A aplicação dessas enzimas, no entanto, pode ser útil para quantificar determinados compostos, ou classes de compostos, que atuem como seus substratos.

Os flavanóis catequina e epicatequina atuam como substratos da tirosinase. Considerando a importância desses flavanóis, que possuem elevadas capacidades antioxidantes e que são os principais compostos dessa classe presentes nos alimentos, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método para quantificá-los, por meio da derivatização oxidativa com tirosinase em solução.

2.3 Fundamentação para o desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento de um método enzimático, para análise de catequina e epicatequina em alimentos, requer que se considere os diversos fatores associados às propriedades desses compostos e da enzima. O conhecimento desses fatores é fundamental para que se selecione uma estratégia analítica adequada, que forneça resultados confiáveis.

Uma estratégia geral para análise de substâncias fenólicas envolve a amostragem, seguida pela extração dos analitos da matriz do alimento, e depois, pela separação, identificação e quantificação (ROBARDS, 2003). Etapas de preparação da amostra, antes de extrair os analitos, são, frequentemente, necessárias para aumentar a eficiência da extração, sendo que as etapas de preparação da amostra e de extração são as mais importantes, seguidas pela identificação e/ou quantificação (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

2.3.1 Seleção de matrizes alimentares

Ao selecionar as matrizes alimentares utilizadas no desenvolvimento do método, é importante considerar que os teores de catequina e epicatequina nos alimentos são predominantemente baixos (BHAGWAT; HAYTOWITZ; HOLDEN, 2014) e que esses compostos podem oxidar no alimento, ou durante a extração (GADKARI; BALARAMAN, 2015). É necessário, ainda escolher matrizes que sejam representativas dos teores esperados nos alimentos. No entanto, é importante desenvolver o método com uma amostra que contenha teores mais elevados dos analitos, para evitar erros na interpretação de falsos resultados negativos. Também é importante aplicar o método em amostras contendo teores variáveis dos analitos, para avaliar sua aplicabilidade.

2.3.2 Preparação de amostras

A preparação da amostra para análise é a primeira etapa e uma das mais importantes para a obtenção de resultados confiáveis (WEBER; SCHULZE-KAYSERS; SCHIEBER, 2014), influenciando, diretamente, a repetibilidade e exatidão da análise (ZHAO et al., 2011). Essa etapa é crítica, pois a matriz do alimento pode conter diverso espectro de compostos biologicamente ativos ou com identidade desconhecida (ANTOLOVICH et al., 2000).

A preparação da amostra e extração dos analitos dependem, principalmente, da natureza da matriz e das propriedades químicas dos analitos, incluindo estrutura molecular, polaridade,

teor no alimento, número de anéis aromáticos e de grupos hidroxilas. A extração completa do analito é dificultada pela formação de complexos com proteínas, carboidratos ou outros componentes do alimento. Dessa forma é difícil escolher um único método de preparação e de extração para analisar diferentes amostras (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

As amostras sólidas são, inicialmente, homogeneizadas, podendo ser congeladas com nitrogênio líquido ou desidratadas, previamente, por meio de liofilização, secagem ao ar ou em estufas (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Amostras líquidas podem ser, inicialmente, filtradas ou centrifugadas e analisadas diretamente, ou então, os analitos podem ser isolados por partição líquido-líquido ou por extração em fase sólida (RIJKE et al., 2006).

O congelamento da amostra com nitrogênio líquido pode ser empregado para inibir a atividade enzimática no alimento. A amostra congelada pode ser moída e liofilizada ou, então, extraída diretamente (ROBARDS, 2003). Geralmente, a liofilização retém níveis maiores dos analitos do que a secagem ao ar (DAI; MUMPER, 2010). Os processos de congelamento e desidratação são importantes para preservar os materiais vegetais contra a degradação, para evitar o crescimento de microrganismos e para concentrar as substâncias de interesse (HAMINIUK et al., 2012).

Outros processos importantes, durante a preparação de amostras, são a redução do tamanho das partículas e a remoção de lipídeos. O uso de amostras finamente moídas melhora a extração, em função do aumento da área superficial e pela maior facilidade em romper as paredes celulares (KIM; LEE, 2005). Maiores rendimentos de extração são alcançados quando se desengordura amostras contendo altos teores de lipídeos. Em geral, é recomendável triturar as amostras, em combinação com secagem e remoção de gorduras, quando apropriado, antes da etapa de extração (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

2.3.3 Extração dos analitos da amostra

O método de extração dos analitos da matriz do alimento, pode influenciar os resultados obtidos na etapa de quantificação, uma vez que muitos processos de extração exibem baixas seletividades e baixos rendimentos. Neste processo pode ocorrer a co-extração de interferentes, tais como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, o que requer etapas posteriores de purificação (GARCIA-SALAS et al., 2010; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; KIM; LEE, 2005; NACZK; SHAHIDI, 2006)

Para superar as limitações dos métodos de extração convencionais, novas técnicas têm sido introduzidas. A extração assistida por ultrassom (EAU) é uma das técnicas não

convencionais mais promissoras (SÃO JOSÉ et al., 2014). Nesta técnica, a amostra moída e homogeneizada é misturada com o solvente adequado e colocada no banho ultrassônico, no qual a temperatura e o tempo de extração são ajustados (GARCIA-SALAS et al., 2010). As ondas ultrassônicas geradas pelo equipamento (entre 20 kHz e 100 MHz) passam através da amostra, gerando cavitação, que é a produção, crescimento e colapso de bolhas (AZMIR et al., 2013). A conversão de energia cinética em calor, aquece o conteúdo das bolhas, que são preenchidas com vapor do solvente a baixa pressão, depois são comprimidas e finalmente implodem por causa da pressão do ultrassom. A onda de choque subsequente causa efeitos químicos, físicos ou mecânicos que resultam na ruptura nas paredes celulares (KIM; LEE, 2005), facilitando a liberação de compostos extraíveis, a penetração do solvente nos materiais celulares, e a transferência de massa (DAI; MUMPER, 2010).

No entanto, uma limitação da EAU é a falta de uniformidade na distribuição do ultrassom pela amostra (AJILA et al., 2011). Além disso, alguns fatores podem influenciar no processo de extração por ultrassom, como o teor de umidade, o tamanho das partículas da amostra, o solvente empregado, a temperatura, a frequência das ondas e o tempo de sonicação (AZMIR et al., 2013; BIESAGA, 2011).

A EAU é uma das técnicas não convencionais mais simples, sendo bem-sucedida para extrair compostos bioativos de diferentes matrizes, em tempos menores e com custo menor do que em outras técnicas de extração (HAMINIUK et al., 2012; IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

2.3.4 Purificação dos extratos contendo os analitos

É possível que haja interferentes nas amostras, uma vez que a catequina e a epicatequina não são os únicos substratos da tirosinase. A sobreposição entre o espectro do analito e dos interferentes pode comprometer os resultados do método, nesse caso, é necessário purificar os extratos para remover interferentes.

A extração em fase sólida (EFS) é uma das técnicas mais utilizadas, com a finalidade de obter certa classe de compostos fenólicos como uma fração (WEBER; SCHULZE-KAYSERS; SCHIEBER, 2014). Nessa técnica, o extrato a ser purificado é introduzido em pequenos cartuchos que contêm microesferas poliméricas com superfície quimicamente ligada a grupos funcionais e que retêm seletivamente os analitos. Antes de introduzir o extrato, os cartuchos são condicionados e equilibrados com solventes apropriados. Os extratos são adicionados (enchimento), e os interferentes são eliminados com um solvente adequado (lavagem). Em seguida, os analitos são eluídos, utilizando outro solvente que possui alta

afinidade com os mesmos. Os eluentes são recolhidos e o solvente pode ser evaporado. Os extratos purificados obtidos podem ser solubilizados, em outro solvente mais apropriado, para quantificação (LUCCI et al., 2012).

Cartuchos com diferentes matrizes poliméricas estão disponíveis, bem como diferentes formas de realizar as etapas de condicionamento e equilíbrio, lavagem, enchimento e eluição. As configurações mais comuns, relatadas na literatura, para isolar a classe dos flavanóis em alimentos, utilizam cartuchos contendo poliamida ou octadecilsilano (C18), os cartuchos são condicionados com metanol, equilibrados com água e enchidos com a amostra, dissolvida em água. A eluição é realizada, principalmente, com metanol ou misturas de metanol e outros solventes como acetonitrila, dimetilformamida ou acetato de etila e, após a eluição, os solventes são evaporados a temperaturas de até 40 °C (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004; BREITFELLNER; SOLAR; SONTAG, 2002; HELLSTRÖM; MATTILA, 2008; DVOŘÁKOVÁ et al., 2007).

2.3.5 Quantificação dos analitos

A determinação da concentração de analitos pode ser feita por diversos métodos, conforme a especificidade e sensibilidade de cada procedimento. A etapa de quantificação do método proposto, no presente trabalho, baseia-se na oxidação do grupo *o*-difenoil, presente no anel B da catequina e da epicatequina, pela tirosinase em solução, para formar *o*-quinonas, como produtos. As *o*-quinonas podem ser determinadas por espectrofotometria (GARCÍA-MOLINA et al., 2007).

Por se tratar de uma reação enzimática, diversos fatores relacionados à atividade da enzima podem influenciar a reação e, conseqüentemente, a quantificação dos analitos. Os principais fatores que influenciam a atividade enzimática são: concentração do substrato, temperatura, pH e presença de inibidores (ARAPOGLOU; LABROPOULOS; VARZAKAS, 2010).

2.3.5.1 *Influência da concentração de substrato*

A concentração do substrato é fundamental para a atividade enzimática. Um incremento na concentração aumenta a taxa de colisões entre a enzima e o substrato, provocando o aumento da atividade (ARAPOGLOU; LABROPOULOS; VARZAKAS, 2010). O efeito da concentração de substrato é avaliado pelo estudo das velocidades iniciais de reação (V_0), em

diferentes concentrações de substrato, utilizando concentrações de enzima muito baixas em relação à do substrato, com isso, a concentração de substrato permanece praticamente constante, durante o início da reação, permitindo que os valores obtidos de V_0 sejam relacionados às concentrações iniciais do substrato e que se obtenha um modelo cinético para a reação (NELSON; COX, 2005).

2.3.5.2 *Influência do pH*

Alterações de pH provocam mudanças na conformação de enzimas e afetam suas atividades (ARAPOGLOU; LABROPOULOS; VARZAKAS, 2010). O pH tem grande efeito sobre a atividade catalítica da tirosinase (MARIA-SOLANO et al., 2016). Em frutas e hortaliças, as polifenol oxidases exibem pHs ótimos no intervalo geral de 4,0 - 7,0. Em valores de pH abaixo de 3,0 estas enzimas são inativadas irreversivelmente (CORZO-MARTÍNEZ et al., 2012).

2.3.5.3 *Influência da Temperatura*

Com o aumento da temperatura, a agitação térmica e as colisões entre enzima e substrato aumentam, o que tende a aumentar a taxa da reação. Entretanto, com o aumento de temperatura também pode ocorrer desnaturação proteica que provoca a inativação enzimática (ARAPOGLOU; LABROPOULOS; VARZAKAS, 2010). O intervalo ótimo de temperatura para as polifenol oxidases encontra-se entre de 30 e 50 °C, mas a estabilidade térmica é comparativamente alta e caracterizada por meias-vidas de diversos minutos no intervalo de 55 – 80 °C, dependendo da fonte (PARKIN, 2010). Alterações significativas na estrutura da tirosinase são observadas acima de 60 °C, podendo levar à inativação enzimática (IONIȚĂ et al., 2014).

2.3.5.4 *Influência de substâncias inibidoras*

As enzimas estão sujeitas a inibição, que pode ser reversível ou irreversível. Os inibidores reversíveis podem ser competitivos, não competitivos ou mistos (NELSON; COX, 2005). Alguns compostos fenólicos podem inibir a tirosinase. A quercetina, encontrada em frutas, e as teaflavinas, presentes em chás, são exemplos de polifenóis que atuam como inibidores dessa enzima. A definição de inibidor da tirosinase é controversa, na literatura, pois diversos autores usam o termo em referência a substâncias que inibem o processo de formação

de melanina, sem levar em conta se a inibição ocorre na etapa inicial, catalisada pela tirosinase. Muitos supostos inibidores da tirosinase são analisados reagindo-os junto com a L-tirosina ou L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) que são os substratos-padrões nas análises de atividade dessa enzima. A atividade é monitorada medindo a formação do dopacromo, que é o produto da reação com esses padrões. Dessa forma, substâncias consideradas inibidores competitivos podem ser, na verdade, substratos que formaram outros produtos não detectados corretamente (CHANG, 2009).

Em decorrência da controvérsia, relacionada à inibição da tirosinase por compostos fenólicos, recentemente, foi proposta uma metodologia que permite diferenciar entre inibidores e substratos alternativos. Essa metodologia é baseada nos graus de inibição da substância analisada sobre as atividades monofenolase e difenolase da enzima, se a substância limita ambas as atividades, ela é considerada inibidora da enzima, caso apenas uma das atividades seja limitada, a substância pode ser inibidora ou substrato (ORTIZ-RUIZ et al., 2015).

2.3.6 Validação analítica

A validação analítica é uma etapa importante, que avalia o desempenho de um método após o seu desenvolvimento. A finalidade dessa etapa é avaliar se o método analítico é adequado à finalidade proposta (BROWN; LISTER, 2014). A validação fornece evidências científicas de que o método é confiável e consistente, para que possa ser usado em análises de rotina (KHLEBNIKOVA, 2013).

O desempenho do método é avaliado de acordo com parâmetros pré-estabelecidos por órgãos de normatização. Em razão das diferenças entre as definições nas normas de cada país, o Conselho Internacional de Harmonização (ICH) padroniza os termos e as metodologias utilizadas na validação de métodos. Os parâmetros de validação mais amplamente aplicados são: seletividade (especificidade), exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de trabalho e robustez (SHABIR, 2004). As definições do ICH para esses termos são:

- Seletividade: capacidade de o método determinar o analito na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz da amostra.
- Exatidão: grau de concordância entre os resultados verdadeiros e os valores encontrados na análise.

- Precisão: grau de concordância entre uma série de medidas obtidas de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea. Pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade
- Repetibilidade: precisão sob as mesmas condições operacionais em um curto intervalo de tempo (mesmo dia).
- Precisão intermediária: precisão dentro do laboratório, avaliada em dias diferentes, e/ou com diferentes analistas e equipamentos.
- Reprodutibilidade: precisão entre laboratórios (em estudos colaborativos para oficialização de metodologias).
- Limite de detecção: a menor quantidade de analito que pode ser detectada na amostra, mas não, necessariamente, quantificada como um valor exato.
- Limite de quantificação: a menor quantidade de analito que pode ser determinada, em uma amostra, com precisão e exatidão aceitáveis.
- Linearidade: habilidade do procedimento (dentro de uma determinada faixa) de obter resultados analíticos que são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) de analito na amostra.
- Faixa de trabalho: intervalo entre a maior e menor concentração de analito na amostra, para as quais tenha sido demonstrado, que o procedimento tenha níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade.
- Robustez: mede a capacidade do método não ser afetado por variações pequenas, mas deliberadas, nos parâmetros experimentais (INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION, 2005).

Diferentes metodologias são utilizadas para determinar os parâmetros de validação analítica. Em métodos espectrofotométricos, a seletividade é avaliada pela semelhança entre os espectros do analito, com o padrão utilizado na análise. Os parâmetros de linearidade, limites de detecção e de quantificação são avaliados a partir da curva de calibração do método (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011).

A exatidão e a precisão são avaliadas analisando amostras certificadas, que contêm teores conhecidos do analito. Quando não há uma amostra certificada, são analisadas matrizes brancas (amostras previamente extraídas, isentas do analito), após fortificá-las, adicionando quantidades conhecidas de padrões do analito. A exatidão é expressa em termos dos teores recuperados, em relação às quantidades adicionadas. A repetibilidade é expressa pelos coeficientes de variação dos resultados obtidos no mesmo dia. Os coeficientes de variação de

análises realizadas em dias diferentes, ou com analistas e equipamentos diferentes, representam a precisão intermediária. O coeficiente de variação das análises realizadas por laboratórios diferentes, em porções da mesma amostra, expressa a reprodutibilidade do método. A exatidão e a precisão são avaliadas, em diferentes níveis de concentração, para determinar a faixa de trabalho do método. Por fim, a robustez é verificada em experimentos fatoriais, nos quais alteram-se, ao mesmo tempo, os níveis de vários parâmetros, que podem afetar os resultados do método, para determinar a influência de pequenas variações nesses parâmetros sobre os resultados (AOAC INTERNATIONAL, 2012).

O desempenho dos métodos é avaliado com base em critérios de aceitação estabelecidos para os parâmetros de validação. A Associação de Comunidades Analíticas (AOAC International) estabelece que os métodos para análise de flavanóis em alimentos, com faixa de trabalho entre 0,05 e 500 mg g⁻¹ *b.u.* devem ter limites de quantificação abaixo de 0,05 mg g⁻¹ *b.u.*, coeficientes de variação de até 6% para repetibilidade e até 8% para reprodutibilidade e exatidões médias entre 90% e 108% em amostras contendo em torno de 0,1% de flavanóis (AOAC INTERNATIONAL, 2013).

Existem diversas etapas a serem seguidas durante o desenvolvimento de um método de análise, que seja robusto para atender às exigências da literatura específica. Em qualquer análise de constituintes de alimentos há fatores que limitam a obtenção de resultados fidedignos. Entretanto, o conhecimento das estruturas, das reações químicas e concentração dos analitos podem auxiliar o desenvolvimento de métodos específicos, sensíveis e práticos. As diversas informações, reunidas nesta revisão de literatura, sobre as propriedades da catequina, da epicatequina e da tirosinase e fundamentam a estratégia adotada no desenvolvimento do método enzimático-espectrofotométrico proposto neste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a aplicação do processo de catálise homogênea, promovido pela enzima tirosinase, no desenvolvimento de um método enzimático-espectrofotométrico para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as condições ótimas de pH e temperatura para a atividade difenolase da tirosinase.
- Determinar o comprimento de onda específico para detectar os produtos de oxidação da catequina e da epicatequina por espectroscopia de absorção molecular;
- Determinar o tempo de reação necessário para oxidar os padrões em solução;
- Desenvolver a curva de calibração para o método com base nas condições otimizadas para a reação enzimática;
- Extrair as catequinas a serem analisadas das amostras, purificar os extratos e quantificar pelo método enzimático-espectrofotométrico desenvolvido;
- Submeter o método proposto ao procedimento de validação analítica com o objetivo de avaliar sua aplicabilidade analítica.
- Aplicar o método desenvolvido em diferentes amostras de alimentos e avaliar sua adequação em cada caso.

REFERÊNCIAS

AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; GODBOUT, S.; VALÉRO, J. R. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, Abingdon, v. 31, n. 3, p. 227–249, 2011.

ANDRÉS-LACUEVA, C.; MEDINA-REMON, A.; LLORACH, R.; URPI-SARDA, M.; KHAN, N.; CHIVA-BLANCH, G.; ZAMORA-ROS, R.; ROTCHES-RIBALTA, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In: LA ROSA, L. A. de; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. (Ed.). **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 53-88.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst**, Londres, v. 125, n. 5, p. 989–1009, 2000.

AOAC INTERNATIONAL. Guidelines for dietary supplements and botanicals: Part I - AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. In: LATIMER, G. W., Jr. (Ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 19. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2012. Appendix K.

AOAC INTERNATIONAL. Standard method performance requirements for flavanols in foods and beverages. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 96, n. 4, p. 699, 2013.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1124–1131, 2004.

ARAPOGLOU, D.; LABROPOULOS, A.; VARZAKAS, T. Enzymes applied in food technology. In: YILDIZ, F. (Ed.). **Advances in food biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2010.

ARCIULI, M.; PALAZZO, G.; GALLONE, A.; MALLARDI, A. Bioactive paper platform for colorimetric phenols detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausana, v. 186, p. 557–562, 2013.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.; OMAR, A. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Enzymes. In: _____. **Food chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. cap. 2, p. 93-158.

BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. **USDA database for the flavonoid content of selected foods**: release 3.1. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory, 2014. 176 p. Disponível em: <<http://goo.gl/Lgd7n4>>. Acesso em: 8 abr. 2015.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdã, v. 1218, n. 18, p. 2505–2512, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Parâmetros e critérios de aceitação de desempenho de um procedimento analítico. In: _____. **Manual de garantia da qualidade analítica**: resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília: MAPA/ACS, 2011. Parte II, p. 25-72. Disponível em: <<http://goo.gl/hpg1lk>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

BREITFELLNER, F.; SOLAR, S.; SONTAG, G. Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. **European Food Research and Technology**, Nova Iorque, v. 215, n. 1, p. 28–31, 2002.

BROWN, P. N.; LISTER, P. Current initiatives for the validation of analytical methods for botanicals. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 25, p. 124–128, 2014.

BROWN, R. S.; MALE, K. B.; LUONG, J. H. A substrate recycling assay for phenolic compounds using tyrosinase and NADH. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 222, n. 1, p. 131–139, 1994.

CASERO, E.; PETIT-DOMÍNGUEZ, M. D.; VÁZQUEZ, L.; RAMÍREZ-ASPERILLA, I.; PARRA-ALFAMBRA, A. M.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination. **Talanta**, Amsterdã, v. 115, p. 401–408, 2013.

CHANG, T.-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, Basiléia, v. 10, n. 6, p. 2440–2475, 2009.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 11, n. 2-3, p. 153–177, 2012.

CHIN, E.; MILLER, K. B.; PAYNE, M. J.; HURST, W. J.; STUART, D. A. Comparison of antioxidant activity and flavanol content of cacao beans processed by modern and traditional Mesoamerican methods. **Heritage Science**, Londres, v. 1, n. 1, p. 9, 2013.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M.; DEL CASTILLO, M. D. Browning reactions. In: SIMPSON, B. K. (Ed.). **Food biochemistry and food processing**. 2. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basileia, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA. **Discovery Studio Visualiser**: release 4.5. San Diego: Dassault Systèmes Biovia, 2015. Disponível em: <<http://goo.gl/xMKaQx>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

DVOŘÁKOVÁ, M.; HULÍN, P.; KARABÍN, M.; DOSTÁLEK, P. Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection. **Czech Journal of Food Sciences**, Praga, v. 25, n. 4, p. 182–188, 2007.

FACCIO, G. **Discovery of oxidative enzymes for food engineering**: tyrosinase and sulfhydryl oxidase. Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland, 2011. (Série: VTT publications, v. 763). Disponível em: <<http://goo.gl/teHwpU>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W.; OLIVEIRA, L. F. de. Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. **The Analyst**, Cambridge, v. 134, n. 11, p. 2320–2328, 2009.

FREIE UNIVERSITÄT BERLIN. Life's inorganic building blocks - copper: "Classical" copper centers in proteins. Disponível em: <<http://goo.gl/N0YWVI>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

GADKARI, P. V.; BALARAMAN, M. Catechins: sources, extraction and encapsulation: a review. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 93, p. 122–138, 2015.

GARCÍA-MOLINA, F.; MUÑOZ, J. L.; VARÓN, R.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA, J. A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 24, p. 9739–9749, 2007.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, Basiléia, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GIADA, M. L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZALEZ, J. A. (Ed.). **Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants**. Viena: InTech, 2013. p. 87–112.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, Hoboken, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HARKENSEE, D.; BEUTEL, S.; YOUNG, M.; ULBER, R. Development of a fast spectroscopic enzyme assay for on-site measurement of total polyphenol content in grapes and wine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 384, n. 4, p. 1013–1018, 2006.

HELLSTRÖM, J. K.; MATTILA, P. H. HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 17, p. 7617–7624, 2008.

HOLLMANN, F.; ARENDS, ISABEL W. C. E.; BUEHLER, K.; SCHALLMEY, A.; BÜHLER, B. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. **Green Chemistry**, Londres, v. 13, n. 2, p. 226–265, 2011.

HÜMMER, W.; SCHREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 12, p. 1381–1398, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, Oxford, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. **Validation of analytical procedures - text and methodology Q2(R1)**, 2005. 17 p. Disponível em: <<http://goo.gl/cpDO0y>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

IONIȚĂ, E.; APRODU, I.; STĂNCIUC, N.; RÂPEANU, G.; BAHRIM, G. Advances in structure-function relationships of tyrosinase from *Agaricus bisporus* - investigation on heat-induced conformational changes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 156, p. 129–136, 2014.

ISMAYA, W. T. **Crystal structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase**, 2011. 102 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Matemática e Ciências Naturais. Universidade de Groningen. Groningen, 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/XQPIYs>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

ISMAYA, W. T.; ROZEBOOM, H. J.; WEIJN, A.; MES, J. J.; FUSETTI, F.; WICHERS, H. J.; DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. **Biochemistry**, Washington, v. 50, n. 24, p. 5477–5486, 2011.

ITOH, S.; FUKUZUMI, S. Monooxygenase activity of type 3 copper proteins. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 40, n. 7, p. 592–600, 2007.

KAINTZ, C.; MAURACHER, S. G.; ROMPEL, A. Type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. In: CHRISTOV, C. Z. (Ed.). **Metal-containing enzymes**. Oxford: Elsevier, 2014. (Série: Advances in protein chemistry and structural biology, v. 97).

KANTEEV, M.; GOLDFEDER, M.; FISHMAN, A. Structure-function correlations in tyrosinases. **Protein Science**, Hoboken, v. 24, n. 9, p. 1360–1369, 2015.

KHLEBNIKOVA, E. W. **Statistical analysis in analytical method validation**, 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/PmPoa0>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, Basiléia, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KIM, D. O.; LEE, C. Y. Extraction and isolation of polyphenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Handbook of food analytical chemistry**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005. p. 471–482.

KIM, K.-I.; LEE, J.-C.; ROBARDS, K.; CHOI, S.-H. Immobilization of tyrosinase in carboxylic and carbonyl group-modified MWNT electrode and its application for sensing phenolics in red wines. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Valencia, v. 10, n. 6, p. 3790–3798, 2010.

KORKUT, S.; ERHAN, E.; YILMAZ, F. Enzyme based phenol biosensors. In: SOMMERSET, V. (Ed.). **Environmental Biosensors**. Viena: InTech, 2011.

LATTANZIO, V.; CARDINALI, A.; LINSALATA, V. Plant phenolics: a biochemical and physiological perspective. In: CHEYNIER, V.; SARNI-MANCHADO, P.; QUIDEAU, S. (Ed.). **Recent advances in polyphenol research**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. (v. 3). p. 1–17.

LATTANZIO, V.; KROON, P. A.; QUIDEAU, S.; TREUTTER, D. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions. In: DAAYF, F.; LATTANZIO, V. (Ed.). **Recent advances in polyphenol research**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2008. p. 1–35.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; GARCÍA-CARMONA, F. Enzymatic and nonenzymatic degradation of polyphenols. In: LA ROSA, L. A. de; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. (Ed.). **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 101-129.

LORRAIN, B.; KY, I.; PECHAMAT, L.; TEISSEDRE, P.-L. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. **Molecules**, Basiléia, v. 18, n. 1, p. 1076–1100, 2013.

LUCCI, P.; PACETTI, D.; NUNEZ, O.; G., N. Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis. In: CALDERON, L. (Ed.). **Chromatography - the most versatile method of chemical analysis**. Viena: InTech, 2012. p. 127–164.

MA, Y.-T.; CHEUNG, P. C. K. Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods: a comparison of structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 10, p. 4222–4228, 2007.

MARIA-SOLANO, M. A.; ORTIZ-RUIZ, C. V.; MUÑOZ-MUÑOZ, J. L.; TERUEL-PUCHE, J. A.; BERNA, J.; GARCIA-RUIZ, P. A.; GARCIA-CANOVAS, F. Further insight into the pH effect on the catalysis of mushroom tyrosinase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdã, v. 125, p. 6–15, 2016.

MIRANDA, C. L.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Flavonoids. In: **eLS**. Londres: John Wiley & Sons, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/nT4vOy>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

MOSCA, L.; MARCO, C. de; VISIOLI, F.; CANNELLA, C. Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 2, p. 297–301, 2000.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdã, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdã, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In: _____. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W.H. Freeman, 2005. Cap. 6, p. 190-237.

NEVEU, V.; PEREZ-JIMÉNEZ, J.; VOS, F.; CRESPIY, V.; DU CHAFFAUT, L.; MENNEN, L.; KNOX, C.; EISNER, R.; CRUZ, J.; WISHART, D.; SCALBERT, A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, Oxford, v. 2010, 2010. Article ID bap024.

OKTEM, H. A.; SENYURT, O.; EYIDOĞAN, F. I.; BAYRAC, C.; YILMAZ, R. Development of a laccase based paper biosensor for the detection of phenolic compounds. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, n. 2, p. 1030–1034, 2012.

ORTIZ-RUIZ, C. V.; GARCIA-MOLINA, M. d. M.; SERRANO, J. T.; TOMAS-MARTINEZ, V.; GARCIA-CANOVAS, F. Discrimination between alternative substrates and inhibitors of tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 8, p. 2162–2171, 2015.

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Ed.). **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 6, p. 263–342.

PEREIRA, A. C.; KISNER, A.; TARLEY, C. R. T.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Determination of phenol compounds based on electrodes with HRP immobilized on oxidized multi-wall carbon nanotubes. In: JAHANSHAH, M. (Ed.). **Nanotechnology I**. Ikenobe: Global Science Books, 2009. (Dynamic biochemistry, process biotechnology and molecular biology, v. 3). Special issue 2, p. 75 – 79.

PREHN, R.; GONZALO-RUIZ, J.; CORTINA-PUIG, M. Electrochemical Detection of Polyphenolic Compounds in Foods and Beverages. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 8, n. 4, p. 472–484, 2012.

PRETZLER, M.; BIJELIC, A.; ROMPEL, A. Fungal tyrosinases: why mushrooms turn brown. In: REEDIJK, J. (Ed.). **Elsevier reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering**. Waltham: Elsevier, 2015.

PRIGENT, S. V. E. **Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties**, 2005. 145 p. Tese (Doutorado) - Advanced Studies in Food Technology, Agrobiotechnology, Nutrition and Health. Universidade de Wageningen. Wageningen, 2005. Disponível em: <<http://goo.gl/ZPvZ8a>>. Acesso em: 1 jul. 2015.

QUIDEAU, S. Plant polyphenols. In: **eLS**. Londres: John Wiley & Sons, 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/Uiy2A6>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie, International Edition**, Weinheim, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A. Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 2388–2395, 2014.

REHDER, D. Metal ion-dependent oxidases and peroxidases. In: REEDIJK, J. (Ed.). **Elsevier reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering**. Waltham: Elsevier, 2015.

RIJKE, E. de; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdã, v. 1112, n. 1-2, p. 31–63, 2006.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, Amsterdã, v. 1000, n. 1-2, p. 657–691, 2003.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M.; ALEMÁN-NAVA, G. S.; RODRÍGUEZ-DELGADO, J. M.; DIECK-ASSAD, G.; MARTÍNEZ-CHAPA, S. O.; BARCELÓ, D.; PARRA, R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 74, p. 21–45, 2015.

ROSE, P. W.; PRLIĆ, A.; BI, C.; BLUHM, W. F.; CHRISTIE, C. H.; DUTTA, S.; GREEN, R. K.; GOODSSELL, D. S.; WESTBROOK, J. D.; WOO, J.; YOUNG, J.; ZARDECKI, C.; BERMAN, H. M.; BOURNE, P. E.; BURLEY, S. K. The RCSB Protein Data Bank: views of structural biology for basic and applied research and education. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, Database issue, 2015. Article ID: D345-D356.

ŞAHİN, S.; DEMİR, C.; MALYER, H. Determination of total phenolic content of *Prunella* L. by immobilized enzyme bioreactor. **Analytical Methods**, Londres, v. 3, n. 4, p. 944, 2011.

SÃO JOSÉ, J. F. B. de; ANDRADE, N. J. de; RAMOS, A. M.; VANETTI, M. C. D.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, Oxford, v. 45, p. 36–50, 2014.

SHABIR, G. A. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. **Journal of Validation Technology**, Duluth, v. 10, p. 314–324, 2004.

STEVANATO, R.; FABRIS, S.; MOMO, F. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 20, p. 6287–6293, 2004.

TRIBALDO, E. B. Phenolic compounds. In: NOLLET, L. M.; TOLDRA, F. (Ed.). **Handbook of Food Analysis**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, Basiléia, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 2010.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. L. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006. 284 p.

VUONG, Q. V.; GOLDING, J. B.; NGUYEN, M.; ROACH, P. D. Extraction and isolation of catechins from tea. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 33, n. 21, p. 3415–3428, 2010.

WEBER, F.; SCHULZE-KAYSERS, N.; SCHIEBER, A. Characterization and quantification of polyphenols in fruits. In: WATSON, R. R. (Ed.). **Polyphenols in plants**: isolation, purification and extract preparation. Amsterdã: Academic Press, 2014. p. 293–304.

ZHAO, J.; LV, G. P.; CHEN, Y. W.; LI, S. P. Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. **Journal of Chromatography A**, Amsterdã, v. 1218, n. 42, p. 7453–7475, 2011

CAPÍTULO 2

ARTIGO – Método espectrofotométrico seletivo, baseado em tirosinase, para quantificar catequina e epicatequina em guaraná em pó e sementes de cacau*

Tiago Dias¹, Mara Reis Silva¹, Clarissa Damiani², Flávio Alves da Silva²

Resumo

A catequina e a epicatequina são compostos fenólicos importantes presentes principalmente em folhas de chás, nas sementes de cacau, e nas cascas e sementes de outras frutas. A detecção seletiva desses compostos por espectrofotometria UV/Visível é limitada pela interferência com outras substâncias que absorvem luz em comprimentos de onda semelhantes. Uma possibilidade, é detectar os produtos de oxidação desses compostos, em comprimentos de onda mais específicos. Este estudo teve o propósito de desenvolver um método analítico para quantificar catequina e epicatequina em conjunto, nas sementes de cacau, a partir da oxidação desses compostos pela enzima tirosinase. As amostras foram extraídas em banho ultrassônico e os extratos, purificados por extração em fase sólida e, submetidos à oxidação com tirosinase em solução. As quinonas formadas na reação foram detectados por espectrofotometria. O método foi seletivo e apresentou linearidade entre 1,21 e 7,26 mg g⁻¹ b.s., limite de detecção de 0,48 mg g⁻¹ b.s. e limite de quantificação de 1,61 mg g⁻¹ b.s. A exatidão do método foi razoável, com recuperações entre 84,3% e 90,7% em matrizes fortificadas. A precisão foi elevada, com baixos coeficientes de variação para repetibilidade (3,17% a 3,68%) e precisão intermediária (3,27%). O total de catequina e epicatequina nas sementes de cacau foi 1,65 mg g⁻¹ b.u. (3,58 mg g⁻¹ b.s.). A aplicabilidade do método foi demonstrada também em guaraná em pó. O método é aplicável para análise espectrofotométrica de catequina e epicatequina em amostras com conteúdo total acima de 1,61 mg g⁻¹ b.s. para esses compostos.

Palavras-chave: catequina, epicatequina, tirosinase, espectrofotometria, método

*Artigo submetido para publicação no periódico Food Analytical Methods (ISSN: 1936-9751)

¹ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Campus Colemar Natal e Silva, 74605-080, Goiânia, Goiás, Brasil

² Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil

Autor Correspondente: Tiago Dias
e-mail: tiagodias@ufg.br
Fone: +55(62)3209-6270
Fax: +55(62)3209-6273

Introdução

A catequina e a epicatequina são compostos fenólicos da classe dos flavanóis que são encontrados principalmente no cacau e derivados, nos chás, em sementes de uvas e, em menor extensão, em frutas, certas leguminosas, hortaliças e castanhas (Bhagwat et al. 2014). O consumo desses compostos nos alimentos foi associado a menores incidências de diabetes do tipo 2 em populações europeias (Zamora-Ros et al. 2014) e estudos *in vitro* demonstraram que essas substâncias inibiram a proliferação de células de certos tipos de câncer (Roleira et al. 2015).

A quantificação de catequina e epicatequina nos alimentos é realizada principalmente por métodos cromatográficos (Ignat et al. 2011; Khoddami et al. 2013; Machonis et al. 2014), que não são acessíveis a muitos laboratórios. Métodos mais práticos para determinação de catequina e epicatequina nos alimentos, baseados em técnicas espectrofotométricas, têm potencial para aplicação na indústria de alimentos e no meio acadêmico, em virtude da importância desses compostos para a saúde.

Os métodos espectrofotométricos, em geral, não apresentam alta seletividade para compostos fenólicos individuais (Tsao 2010), e têm sido empregados principalmente para a análise de fenólicos totais, como, por exemplo, o método de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi Junior 1965).

Uma das formas de aumentar a seletividade de métodos espectrofotométricos é derivatizar o composto de interesse, por meio de reações químicas, para formar produtos que são detectados em comprimentos de onda específicos (Weber et al. 2014). Essa abordagem é utilizada nos métodos da vanilina e DMACA (4-dimetilamina-cinamaldeído) para quantificar flavanóis, após derivatizar esses compostos. Entretanto, esses métodos são sujeitos à instabilidade dos produtos coloridos formados na derivatização, além de serem mais utilizados para análise de proantocianidinas (taninos condensados) (Hummer e Schreier 2008).

A catequina e a epicatequina, por serem compostos o-difenólicos, podem ser oxidadas por enzimas como as tirosinases e as catecol oxidases. Essas enzimas oxidam o-difenóis e formam o-quinonas como produtos (Kanteev et al. 2015). As o-quinonas possuem coloração intensa e podem ser detectadas por espectrofotometria, em comprimentos de onda específicos, desde que permaneçam estáveis em solução (García-Molina et al. 2007).

A tirosinase de cogumelo (*Agaricus bisporus*, EC 1.14.18.1) tem sido utilizada no desenvolvimento de biosensores enzimáticos para detectar compostos fenólicos por meio de catálise heterogênea (Prehn et al. 2012). Entretanto, há poucos estudos (Harkensee et al. 2006; Mosca et al. 2000) utilizando essa enzima em solução (catálise homogênea) para quantificar compostos fenólicos. A catálise homogênea com tirosinase para oxidar a catequina e a epicatequina em solução, poderia ser empregada para desenvolver um método espectrofotométrico

seletivo para analisar essas substâncias. Essa abordagem também é mais prática que a construção de eletrodos com a enzima imobilizada.

O cacau, por ser um alimento difundido em várias regiões do mundo e por conter teores elevados de catequina e epicatequina pode ser considerado uma matriz adequada ao desenvolvimento de um método espectrofotométrico para quantificar esses compostos. O objetivo deste trabalho foi investigar a quantificação de catequina e epicatequina em sementes de cacau (*Theobroma cacao*), a partir da derivatização seletiva desses compostos com a enzima tirosinase em solução, seguida pela detecção espectrofotométrica das quinonas formadas.

Parte experimental

Materiais

(-)-Epicatequina, (+)-catequina dihidratada, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), tirosinase de cogumelo (*Agaricus bisporus*) liofilizada (código T3824-50KU) e cartuchos para extração em fase sólida (EFS) de 12 mL, com 1,0 g de poliamida (Discovery DPA-6S) foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Ácido etilenodiamino-tetracético, sal dissódico (EDTA), fosfato de potássio dibásico anidro, fosfato de potássio monobásico anidro, hidróxido de amônio, metanol e ácido acético glacial foram adquiridos da Vetec Química (Duque de Caxias, Brasil).

Preparo de soluções

Foram utilizados reagentes com grau analítico e água ultrapura (purificador Millipore Direct Q3, Barueri, Brasil). Todo o conteúdo do frasco de tirosinase (8,66 mg) foi dissolvido em água, até completar 50 mL, para obter a solução estoque da enzima. Aliquotas de 2,5 mL da solução estoque foram transferidas para 20 tubos de ensaio com tampa, os tubos foram congelados a -20 °C, até o preparo de soluções de trabalho de tirosinase. As soluções de trabalho foram obtidas diluindo 2,5 mL da solução estoque da enzima para 10 mL com água, resultando em soluções com 43,3 µg mL⁻¹ de tirosinase. Aliquotas de 2,0 mL da solução de trabalho foram transferidas para tubos de ensaio com tampa e congeladas a -20 °C até o uso. Tampões fosfato de potássio 0,05 mol L⁻¹ foram preparados misturando fosfato de potássio monobásico 1,0 mol L⁻¹ e fosfato de potássio dibásico 1,0 mol L⁻¹ em quantidades calculadas pela equação de Henderson-Haselbalch. Os tampões foram armazenados a 4 °C por até uma semana. Soluções com padrões de catequina e epicatequina, entre 0,15 e 0,9 mmol L⁻¹, foram preparadas em tampão fosfato pH 6,2 (pHmetro Bel W3B, Piracicaba, Brasil), e utilizadas no mesmo dia. Soluções de extração (70% de metanol, 29,5% de água e 0,5% de ácido acético) foram preparadas e armazenadas por até uma semana em temperatura ambiente.

Determinação da temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática

A temperatura e o pH ótimos, para a atividade difenolase da tirosinase, foram determinados pela metodologia de superfície de resposta, por meio do delineamento composto central rotacional (DCCR) com dois níveis para cada fator, quatro pontos axiais e cinco repetições no ponto central (Tabela 2.1). Os níveis de cada fator foram determinados em experimentos fatoriais preliminares (2²) utilizando o método do gradiente ascendente (Neto et al. 2010).

Tabela 2.1. Delineamento composto central rotacional utilizado para determinar a temperatura e o pH ótimos para a atividade difenolase da tirosinase.

	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
pH	5,2	5,5	6,2	6,9	7,2
Temperatura	34	36	41	46	48

As atividades difenolase (Sigma-Aldrich 1998), obtidas como resposta foram ajustadas pelo modelo polinomial de segunda ordem (Eq 1), para estimar os coeficientes de regressão (β_1 a β_6), conforme o método dos mínimos quadrados. O ajuste do modelo foi avaliado por análise de variância e análise dos resíduos de regressão. O ponto ótimo para o pH e a temperatura foi obtido pela maximização da função de desejabilidade global.

$$y = \beta_1 + \beta_2 \cdot pH + \beta_3 \cdot T + \beta_4 \cdot pH^2 + \beta_5 \cdot T^2 + \beta_6 \cdot pH \cdot T \quad (\text{Eq. 1})$$

Seleção do comprimento de onda e do tempo de reação

Reações de oxidação foram realizadas, nas condições ótimas de pH e temperatura estabelecidas, com base nas quantidades de soluções utilizadas no método de Sigma-Aldrich (1998), utilizando catequina ou epicatequina, como substratos. Foram misturados 1,0 mL das soluções padrões de catequina ou epicatequina com 0,1 mL de solução trabalho de tirosinase diluída em 1,9 mL de tampão fosfato pH 6,2. Os espectros dos produtos de reação foram determinados, após estabilização da cor dos produtos, na faixa entre 250 e 600 nm (espectrofotômetro Jasco V-630, Tóquio, Japão). O comprimento de onda de maior absorção (380 nm) foi selecionado e novos experimentos foram realizados, nas mesmas condições, com leitura das absorbâncias neste comprimento de onda, a cada 4 min, até o equilíbrio, para estabelecer o tempo da reação.

Curvas de calibração

Alíquotas de 1,0 mL das soluções padrão foram misturadas com 1,9 mL de tampão fosfato pH 6,2 a 0,05 mol L⁻¹ e 0,1 mL da solução de trabalho de tirosinase em tubos de ensaio e em seguida, os tubos foram aquecidos a 38,0 °C (banho ultratermostático, Cienlab CE 110/6, Piracicaba, Brasil) por 40 min. As absorbâncias dos produtos

foram determinadas a 380 nm. As curvas foram ajustadas por regressão linear ($y = a \cdot x + b$) utilizando o método dos mínimos quadrados e o ajuste foi avaliado pela análise de variância do modelo linear e pela análise dos resíduos de regressão.

Preparação das amostras

Os frutos de cacau, utilizados no desenvolvimento do método, foram adquiridos na Central de Abastecimento do Estado de Goiás (Goiânia, Goiás, Brasil). Os frutos foram lavados em água corrente e higienizados em hipoclorito de sódio a 150 ppm antes do corte. As cascas foram removidas e as sementes, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, moídas (moinho analítico IKA A11 Basic, Staufen, Alemanha) e liofilizadas durante 12 h a -55 °C e pressão absoluta < 200 µmHg (liofilizador Liotop LH108, São Carlos, Brasil). As amostras liofilizadas foram novamente moídas e armazenadas a -20 °C até serem extraídas. Os teores de umidade foram determinados (AOAC International 1998), antes e depois da liofilização, por secagem em estufa (Tecnal, TE-395, Piracicaba, Brasil) a 100 °C, até peso constante.

Após o desenvolvimento e avaliação dos resultados, com a amostra de cacau, o método foi empregado para analisar maçãs com cascas (*Malus domestica*), pó de sementes de guaraná (*Paullinia cupana*) e folhas de camélia (*Camellia sinensis*) secas, em sachês (chá branco, chá verde, chá preto), adquiridas em supermercados locais. As maçãs foram preparadas de forma semelhante ao cacau. As folhas de chás foram removidas dos sachês e moídas; o pó de sementes de guaraná, pronto para consumo, foi analisado sem preparação prévia.

Extração

A catequina e a epicatequina foram extraídas das amostras pelo método de Machonis et al. (2014), com modificações. Durante o desenvolvimento do método, foram utilizadas massas de 0,25 g, 0,5 e 1,0 g da amostra de cacau. As amostras foram desengorduradas, com 10 mL de hexano, sob agitação, por 1 min (agitador tipo vórtex B. Braun Biotech, Melsungen, Alemanha) e, em seguida, submetidas ao ultrassom (banho ultrassônico Unique USC-2800A, Indaiatuba, Brasil) a 50 °C, por 5 min e centrifugadas, por 5 min, a 1006 g (centrífuga MPW-350R, Varsóvia, Polônia). Este processo foi repetido três vezes, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram deixados abertos durante a noite, para evaporar os resíduos de solvente. No dia seguinte foram adicionados 10 mL do solvente usado na extração (70% metanol, 29,5% água, 0,5% ácido acético), as misturas foram agitadas, por 1 min, no agitador vórtex, em seguida, foram submetidas à extração no banho ultrassônico, por 5, min a 50 °C e centrifugadas, por 5 min, na velocidade de 1006 g. Os extratos foram recolhidos e evaporados (evaporador rotativo Tecnal TE-211, Piracicaba, Brasil), por 15 min, a 40 °C, para remoção do metanol (extratos brutos). Testes foram

realizados para detectar catequina e epicatequina no extrato bruto, pelo método desenvolvido, entretanto, os resultados não foram satisfatórios. Foi necessário purificar os extratos, por extração em fase sólida (EFS), antes de reagir com a enzima. Após o desenvolvimento, a massa de 0,25 g foi selecionada e a extração foi realizada, nas mesmas condições experimentais, com três repetições de 0,25 g para cada amostra.

Purificação dos extratos

A purificação dos extratos brutos, por extração em fase sólida (EFS), foi realizada de acordo com o método de Arabbi et al. (2004), com modificações. Cartuchos de EFS de 12 mL, contendo 1 g de poliamida, acoplados em dispositivo a vácuo (Supelco Visiprep 57030-U, Bellefonte, EUA), foram previamente condicionados, com 10 mL de metanol e equilibrados, com 20 mL de água. Os extratos brutos foram transferidos para os cartuchos que, em seguida, foram lavados com 20 mL de água, para remoção dos interferentes. As catequinas e epicatequinas foram eluídas, com 20 mL de metanol e os eluentes foram coletados, em balões de evaporação de 50 mL. Os balões foram levados ao evaporador rotativo, a 40 °C, durante 25 min, para remoção do metanol. Os extratos aquosos obtidos foram, então, diluídos para 10 mL com tampão fosfato pH 6,2. Os cartuchos usados foram lavados, com 20 mL de metanol contendo 0,5% de hidróxido de amônio, depois com 20 mL de metanol e com 20 mL de água.

Quantificação

Aliquotas entre 0,1 e 1,0 mL do extrato purificado por EFS foram avaliadas, durante o desenvolvimento, do método. As aliquotas foram misturadas com solução tampão pH 6,2 até completar 2,9 mL. Foram adicionados 0,1 mL de solução de trabalho de tirosinase e os tubos foram agitados. A mistura reagiu por 40 min em banho maria a 38 °C e as absorbâncias foram determinadas entre 250 nm a 600 nm. Os valores de absorbância em 380 nm foram utilizados na equação da curva de calibração, para calcular as concentrações. Após o desenvolvimento, a alíquota de 1,0 mL foi escolhida. A etapa de quantificação foi realizada em triplicata para cada extrato purificado.

Avaliação do método

O desempenho do método proposto foi avaliado de acordo com os requisitos da AOAC International para análise de flavanóis em alimentos (AOAC International 2013). A linearidade e os limites de detecção e de quantificação foram determinados por meio da curva de calibração com epicatequina, repetida durante três dias com seis níveis de concentração e três réplicas por nível. A faixa linear foi a região em que os resíduos do modelo de regressão apresentaram distribuição normal (teste de Shaphiro-Wilk). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas equações: $LD = y_B + 3S_B$ e $LQ = y_B + 10S_B$ sendo y_B a absorbância do

branco e S_B o desvio padrão das leituras do branco ($n = 9$). A exatidão e a precisão foram determinadas pela análise de matrizes de cacau (amostras previamente extraídas) fortificadas com epicatequina, em três níveis da curva de calibração: nível central ($0,35 \text{ mmol L}^{-1}$, $4,2 \text{ mg g}^{-1}$ b.s.), nível inferior ($0,21 \text{ mmol L}^{-1}$, $2,5 \text{ mg g}^{-1}$ b.s.) e nível superior ($0,49 \text{ mmol L}^{-1}$, $5,9 \text{ mg g}^{-1}$ b.s.). As análises nas matrizes fortificadas foram repetidas por três dias consecutivos para avaliar a precisão intermediária, com três repetições de cada nível de fortificação por dia para avaliar a repetibilidade. A exatidão foi expressa pelo percentual de recuperação do analito em relação às quantidades adicionadas nas matrizes e a precisão foi calculada pelos coeficientes de variação dos teores recuperados nas análises. Os resultados de exatidão e precisão foram avaliados por análise de variância para o modelo com efeitos mistos, conforme Eudey (2007), utilizando o software SAS University Edition. As demais análises estatísticas foram realizadas no software Minitab 17. Os testes de hipótese foram realizados ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática

O modelo de segunda ordem ajustou significativamente os resultados experimentais da atividade difenolase ($p < 0,05$). O termo de interação entre o pH e a temperatura (T) não foi significativo ($p = 0,455$) e o modelo foi reajustado sem este termo (Eq. 2). Os resíduos da regressão não apresentaram desvios significativos da normalidade ($p = 0,423$, no teste de Shapiro-Wilk) e o modelo não apresentou falta de ajuste significativa ($p = 0,333$). O coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,9391.

$$y = -37157 + 9997 \cdot pH + 623 \cdot T - 814 \cdot pH^2 - 8,31 \cdot T^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Os pontos ótimos para o pH e a temperatura foram 6,2 e 38°C , respectivamente. A estimativa para a atividade difenolase no ponto ótimo foi de $5217 \text{ unidades mL}^{-1}$ da solução de trabalho de tirosinase (Fig. 2.1).

A tirosinase apresentou atividade ótima em pH levemente ácido (6,2) e temperatura moderada (38°C), o que está próximo aos resultados de outros autores. Faccio (2011) e Sigma-Aldrich (2006) relataram o pH ótimo para a tirosinase obtida de *Agaricus bisporus* entre 6,0 e 7,0. Duarte et al. (2012) obtiveram o pH ótimo de 6,6 para tirosinase do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

A temperatura ótima de 38°C utilizada no método encontra-se dentro da faixa de estabilidade térmica da enzima. De acordo com Zaidi et al. (2014), a temperatura ótima para a atividade da enzima é 35°C . Parkin (2010) afirma que as polifenoloxidasas têm atividade ótima entre 30 e 50°C e que essas enzimas possuem estabilidade

térmica comparativamente alta, com meias-vidas de diversos minutos no intervalo entre 55 e 80 °C. Ioniță et al. (2014) observaram alterações na estrutura da tirosinase acima de 60 °C, com possível inativação da enzima.

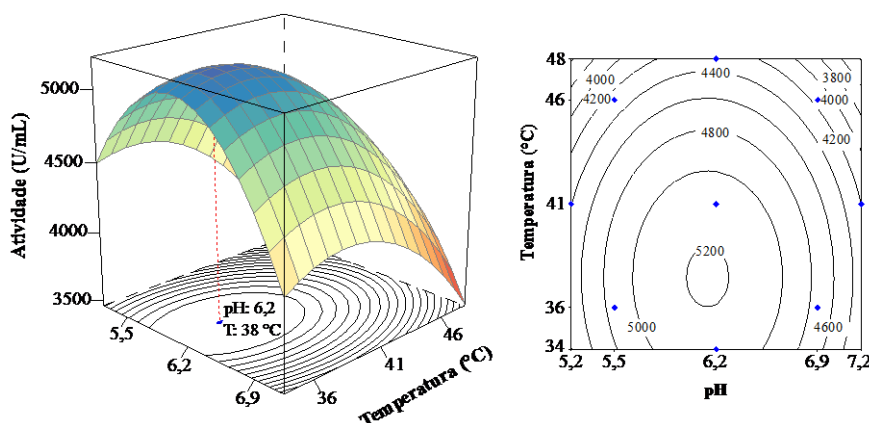


Fig. 2.1. Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado para a atividade difenolase da tirosinase em função do pH e da temperatura. Ponto ótimo: pH = 6,2, temperatura = 38,0 °C, Atividade = 5217 unidades mL⁻¹ de tirosinase (43,3 µg mL⁻¹). Volume tirosinase: 0,1 mL

Comprimentos de onda para detectar os produtos de oxidação

Após a oxidação dos padrões de catequina e epicatequina, nas condições ótimas de pH e temperatura, houve o surgimento de bandas com intensa absorção entre 300 e 550 nm (Fig. 2.2). O produto de oxidação da epicatequina teve um pico mais intenso em torno de 380 nm, enquanto o produto de oxidação da catequina apresentou uma banda de absorção menos intensa e mais alargada, com máximo em 394 nm.

Os resultados foram compatíveis com o espectro da o-quinona (1,2-benzoquinona) formada pela oxidação de catecol (1,2-benzenodiol) (Albarran et al. 2010), o que permite identificar os produtos formados como o-quinonas derivadas da catequina e da epicatequina.

Tempo de reação

Os experimentos realizados no ponto ótimo mostraram que a taxa de reação foi mais acentuada nos primeiros 15 minutos, após a adição da enzima (Fig 2.3). Após esse tempo, a velocidade da reação diminuiu acentuadamente até entrar em equilíbrio aos 40 minutos. O tempo de reação foi influenciado pela concentração do substrato, levando mais tempo para estabilizar nas concentrações superiores avaliadas. Os produtos de oxidação formados permaneceram estáveis em solução, uma vez que não houve diminuição da absorbância ao longo do tempo, possibilitando assim sua determinação espectrofotométrica.

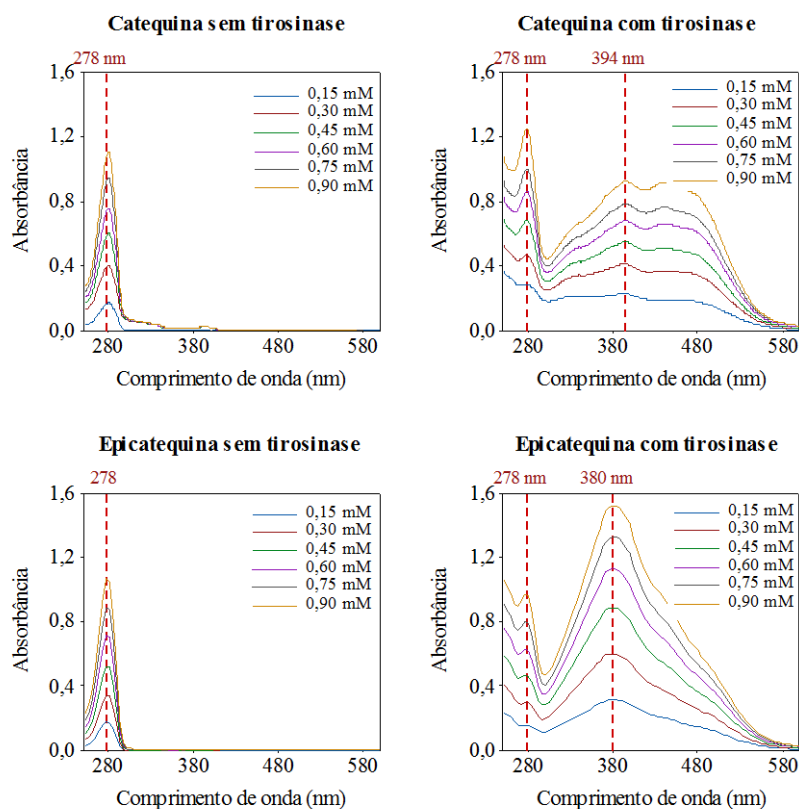


Fig. 2.2. Espectros de absorção para os produtos da reação da catequina e da epicatequina com a tirosinase. Condições: 1,0 mL dos padrões (0,15 – 0,9 mM), 1,9 mL de tampão pH 6,2 e 0,1 mL tirosinase ($43,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), tempo de reação: 40 min, temperatura: $38,0^\circ\text{C}$

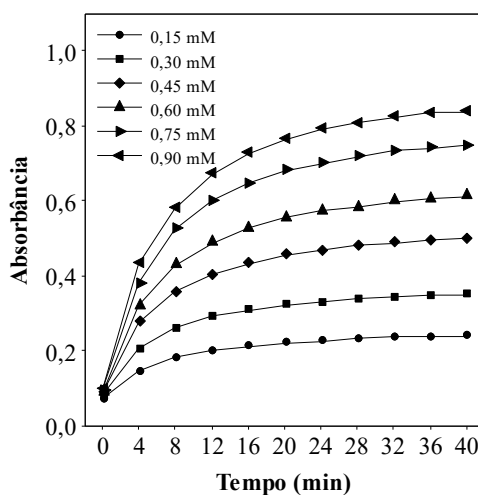


Fig. 2.3. Absorbâncias dos produtos de oxidação de soluções de catequina pela tirosinase. Condições: 1,9 mL de tampão fosfato pH 6,2; 1,0 mL de solução de catequina ($0,15 - 0,90 \text{ mmol L}^{-1}$); 0,1 mL de solução de tirosinase ($43,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), temperatura de $38,0^\circ\text{C}$.

Efeito da purificação dos extratos por EFS

A reação enzimática com os extratos brutos, sem purificação por EFS, não formou produtos coloridos que pudessem ser quantificados (Fig 2.4-A). É possível que inibidores da enzima estivessem presentes nesses extratos, impedindo a reação. Determinados compostos fenólicos, incluindo flavonoides com estruturas parecidas às dos substratos da tirosinase podem atuar como inibidores da enzima (Corzo-Martínez et al. 2012; Orhan e Khan 2014).

Após reagir os extratos purificados por EFS com a tirosinase houve a formação de produtos amarelos, que foram detectados em 380 nm (Fig 2.4-B). A EFS é utilizada para purificar extratos de flavanóis em análises cromatográficas (Arabbi et al. 2004; Hellström e Mattila 2008). Kofink et al. (2007) demonstraram que extratos de guaraná purificados com cartuchos de poliamida ficaram isentos de interferentes, que poderiam prejudicar a análise de catequina e epicatequina.

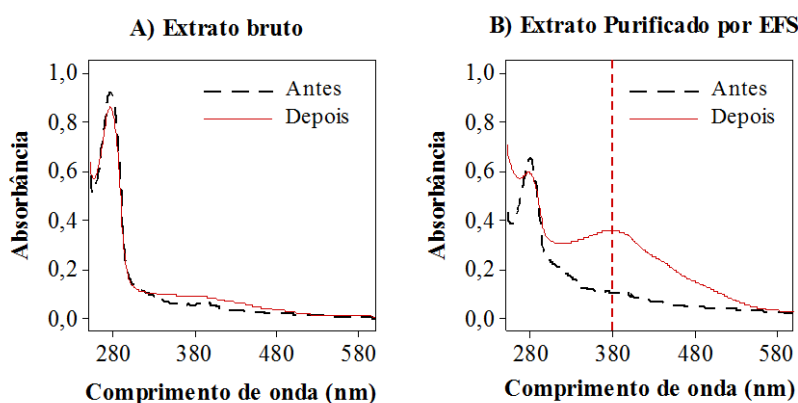


Fig. 2.4. Espectros de absorção dos extratos (bruto e purificado por EFS) de cacau, dissolvidos tampão pH 6,2, antes e depois da reação com 0,1 mL de tirosinase em 1,9 mL de solução tampão pH 6,2. Temperatura: 38,0 °C; Tempo: 40 min.

Otimização da massa de amostra e da alíquota de extrato

No desenvolvimento do método com a amostra de cacau, o uso de 1,0 g de amostra e alíquotas de 0,1 e 0,25 mL do extrato forneceram resultados dentro da faixa de trabalho do método (Fig. 2.5A e Fig. 2.5B); a alíquota de 0,5 mL extrapolou a faixa de trabalho (Fig. 2.5-C). A extração foi então otimizada, reduzindo a massa de amostra, para evitar a saturação dos cartuchos de EFS, e aumentando proporcionalmente a alíquota de extrato utilizada (Fig. 2.5D-F). A massa de 0,25 g de amostra e a alíquota de 1,0 mL do extrato (Fig. 2.5F) foram escolhidos em decorrência da maior resolução obtida com essas condições. As mesmas quantidades foram utilizadas, posteriormente, na análise das amostras de guaraná em pó, maçã e chás.

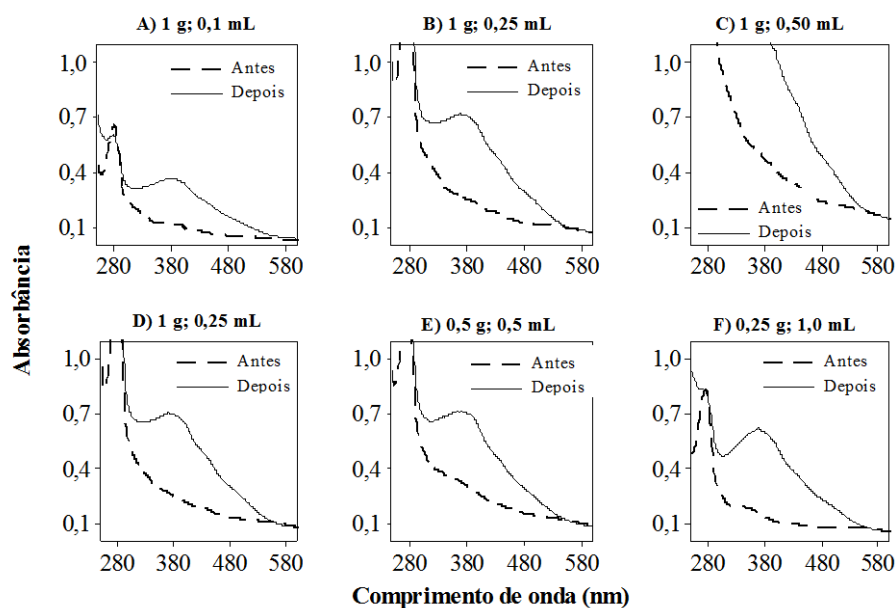


Fig. 2.5. Espectros de absorção dos extratos de cacau purificados por EFS, antes e depois da reação com tirosinase nas condições experimentais do método. Massa de amostra: 0,25 – 1,0 g em 10 mL de extrato. Aliquota de extrato: 0,1 – 1,0 mL.

Avaliação do método

O desempenho do método para analisar catequina e epicatequina em sementes de cacau foi satisfatório. Os espectros dos produtos formados após a oxidação dos extratos purificados por EFS foram compatíveis com os dos produtos de oxidação de catequina e epicatequina. Isto indica que o método apresentou seletividade adequada para esses compostos. Entretanto, o método desenvolvido foi incapaz de distinguir entre a catequina e a epicatequina, por causa da absorção de luz em comprimentos de onda próximos, pelas quinonas derivadas desses compostos. Assim, o resultado analítico é referente ao somatório dos teores de catequina e epicatequina.

A curva de calibração do método ($y = 1,8046x + 0,0639$) apresentou linearidade entre 0,1 e 0,6 mmol L⁻¹ (1,21 – 7,26 mg g⁻¹ b.s.). A correlação nesse intervalo foi elevada ($r^2 = 0,9942$) e os resíduos de regressão não apresentaram desvios da normalidade ($p = 0,8$). Os limites de detecção e de quantificação foram respectivamente 0,04 mmol L⁻¹ (0,48 mg g⁻¹ b.s.) e 0,13 mmol L⁻¹ (1,61 mg g⁻¹ b.s.). A exatidão variou entre 82,9% e 93,1% nos ensaios. Houve diferença entre as quantidades de padrão recuperadas nos três níveis de fortificação (Tabela 2.2), o que indica que a exatidão do método foi maior nos níveis inferiores de concentração.

Os coeficientes de variação (CV) para os resultados de análises realizadas em um mesmo dia (repetibilidade) e para os resultados das análises realizadas em três dias diferentes (precisão intermediária) (Tabela 2.3) atendem ao critério de aceitação para a precisão ($CV < 6\%$), estabelecido pela AOAC International (2013).

Tabela 2.2. Exatidão do método para a análise de matrizes brancas de cacau fortificadas com padrões em três níveis de concentração.

Nível de fortificação (mg g ⁻¹ b.s.)	Exatidão dos ensaios por dia (%)									Exatidão média* (%)	Intervalo de confiança (95%)	
	Dia 1			Dia 2			Dia 3				Inferior	Superior
2,5	88,4	90,6	93,1	90,2	90,3	91,4	91,9	91,4	89,2	90,7 ^a	89,6	91,8
4,2	87,1	88,4	86,7	87,0	86,5	86,5	87,6	86,8	87,3	87,1 ^b	86,2	88,0
5,9	84,1	82,9	84,9	85,4	84,1	83,8	84,8	83,8	84,5	84,3 ^c	82,7	85,8

* A exatidão é expressa com base nos percentuais de recuperação do padrão de epicatequina adicionado em matrizes de cacau previamente extraídas. Resultados com letras diferentes diferem significativamente ao nível de 5%, com base nos intervalos de confiança calculados pela aproximação de Satterthwaite utilizando a PROC MIXED do SAS (Eudey 2007).

Tabela 2.3. Precisão do método, calculada com base nos coeficientes de variação dos teores de padrão recuperados nos ensaios.

Nível de fortificação/ dia (mg g ⁻¹ b.s.)	Dia 1			Dia 2			Dia 3		
	2,5	4,2	5,9	2,5	4,2	5,9	2,5	4,2	5,9
Recuperação (%)	88,4	87,1	84,1	90,2	87,0	85,4	91,9	87,6	84,8
	90,6	88,4	82,9	90,3	86,5	84,1	91,4	86,8	83,8
	93,1	86,7	84,9	91,4	86,5	83,8	89,2	87,3	84,5
CV ensaio (%)	2,59	0,98	1,22	0,75	0,33	1,03	1,57	0,46	0,61
CV repetibilidade (%)	3,68			3,17			3,33		
CV precisão intermediária (%)				3,27					

Análise das amostras

Produtos de coloração amarelos foram observados, após a oxidação dos extratos purificados de cacau e guaraná pela tirosinase. Estes produtos apresentaram uma banda de absorção intensa em torno de 380 nm (Fig. 2.6A e Fig. 2.6B). Embora tenha ocorrido a formação de produto de coloração amarela na oxidação dos extratos de maçã, houve apenas pequenas alterações no espectro, que não foram suficientes para produzir um pico relacionado a um dos padrões analisados (Fig. 2.6C). Para as amostras de chás não houve formação de produtos coloridos e alterações significativas nos espectros (Fig. 2.6D-F). Desse modo, não foi possível quantificar catequina e epicatequina em maçã e chás pelo método proposto no presente estudo.

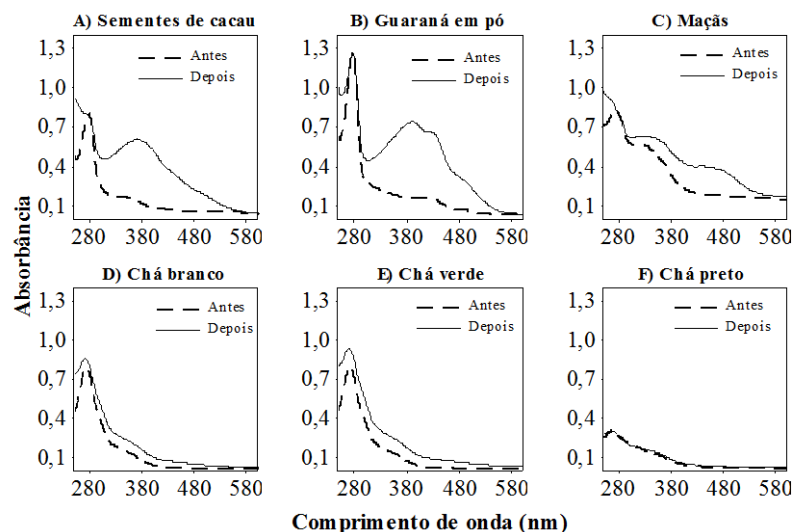


Fig. 2.6. Espectros de absorção dos extratos purificados por EFS, antes e depois da reação com tirosinase, para as amostras analisadas, nas condições experimentais do método. Massas de amostra: 0,25 g. Volume do extrato: 10,0 mL. Aliquota do extrato: 1,0 mL.

Teaflavinas, presentes nas folhas de chás, são inibidores da tirosinase (Zhou et al. 2014), e podem ter interferido na oxidação da catequina e da epicatequina nessas amostras. Além disso, os baixos teores de catequina e epicatequina nas folhas secas de chás podem ter comprometido a detecção desses compostos. Estas substâncias são abundantes nas folhas de chá frescas, entretanto, essas moléculas apresentam baixa estabilidade oxidativa (Gadkari e Balaraman 2015) e durante os processos de fermentação e secagem envolvidos na produção dos chás, oxidam dando origem às teaflavinas e tearubiginas (Vuong et al. 2010).

O conteúdo de catequina e epicatequina determinado no cacau (Tabela 2.4) foi compatível com os teores catalogados para esse alimento, no banco de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (Bhagwat et al. 2014).

Dentre os 502 alimentos indexados no banco de dados do USDA, em 132 alimentos ocorreu a presença de catequina e/ou epicatequina. Em 72 desses alimentos o teor dessas substâncias variou entre 0,01 e 0,10 mg g⁻¹ e em apenas seis alimentos o teor total de catequina e epicatequina foi superior a 1,0 mg g⁻¹.

Os resultados do método desenvolvido posicionam corretamente o cacau e o guaraná entre os alimentos com maiores teores de catequina e epicatequina. No entanto, Gotti et al. (2006) e Chin et al. (2013) reportaram teores maiores em relação aos encontrados no presente estudo (Tabela 2.4). Os teores encontrados por esses autores, entretanto, são superiores aos conteúdos de catequina e epicatequina presentes na maioria dos alimentos. O maior valor relatado no banco de dados Phenol Explorer (Neveu et al. 2010) para o conteúdo de catequina e epicatequina em alimentos é 2,66 mg g⁻¹, encontrado em amostras de cacau em pó.

Tabela 2.4. Teores de catequina e epicatequina em amostras de cacau e guaraná obtidos pelo método desenvolvido em comparação com resultados da literatura.

Amostra	Este trabalho		Dados da literatura		
	CA + EC* (mg g ⁻¹)	Umidade (%)	CA + EC (mg g ⁻¹ b.u)	Umidade (%)	Referência
Sementes de cacau	1,65 ± 0,04 (b.u.)	53,86 ± 0,04	1,87	ND	(Sakakibara et al. 2003)
	3,58 ± 0,08 (b.s.)		6,70	5,5 – 6,5	(Chin et al. 2013)
			4,16	ND	(Gotti et al. 2006)
Guaraná em pó	4,20 ± 0,06 (b.u.)	8,65 ± 0,06	6,29	8,84	(Marques et al. 2016)
	4,60 ± 0,07 (b.s.)		6,45	ND	(Majhenič et al. 2007)
			4,37	ND	(Bittencourt et al. 2013)

* Soma dos teores de catequina (CA) e epicatequina (EC), expressa como média ± desvio padrão (N = 3), em base úmida (b.u.) ou base seca (b.s.). ND: dados não disponíveis.

Os bancos de dados do USDA e o Phenol Explorer não apresentam resultados para amostras de guaraná em pó, entretanto, Yonekura et al. (2016) afirmam, com base em outras referências que as sementes de guaraná são uma fonte mais rica em epicatequina (6,0 a 25 mg g⁻¹) do que o cacau em pó (0,18 a 4,6 mg g⁻¹). O resultado obtido pelo método desenvolvido, para a amostra de guaraná em pó é menor, mas com ordem de grandeza próxima dos resultados obtidos por outros autores para este alimento (Tabela 2.4).

Ao confrontar o limite de quantificação do método (1,61 mg g⁻¹ b.s.) com os teores de catequina e epicatequina presentes nos alimentos, aponta-se para uma limitação do método: poucos alimentos contêm teores de catequina elevados o suficiente para serem quantificados por essa metodologia. Os teores relativamente baixos de catequina e epicatequina em alimentos decorrem, dentre outros fatores, da baixa estabilidade oxidativa desses compostos, que quando expostos ao oxigênio, a elevadas temperaturas ou, até mesmo enzimas oxidativas presentes nos alimentos, podem reagir para formar outros produtos (Gadkari e Balaraman 2015). Uma alternativa é aplicar o método para analisar amostras contendo maiores teores de catequina e epicatequina, como as folhas frescas de chás ou cascas e sementes de frutas.

Outra alternativa baseia-se no fato de que a catequina e a epicatequina são os principais monômeros constituintes das proantocianidinas (taninos condensados). As proantocianidinas estão presentes em teores

elevados nos alimentos (Tarascou et al. 2010); entretanto, o principal método espectrofotométrico para quantificar esses compostos possui limitações (Makkar et al. 1999) e os teores desses compostos relatados na literatura estão amplamente subestimados (Pérez-Jiménez et al. 2009). A despolimerização das proantocianidinas para formar monômeros de catequina e epicatequina, e a detecção desses compostos pelo método enzimático-espectrofotométrico desenvolvido pode ser uma alternativa para analisar os teores de proantocianidinas nos alimentos.

Conclusões

Neste trabalho o conteúdo total de catequina e epicatequina, em sementes de cacau foi determinado por um método espectrofotométrico seletivo e preciso com base na oxidação desses compostos por tirosinase. O método mostrou-se aplicável também em guaraná em pó, entretanto, o limite de quantificação ($1,61 \text{ mg g}^{-1} \text{ b.s.}$) limita sua aplicação para matrizes com conteúdos mais baixos de catequina e epicatequina. Os resultados obtidos para as sementes de cacau e para o guaraná em pó são consistentes com outros resultados da literatura, indicando que o método pode ser aplicado a essas amostras de forma precisa. A aplicação do método a outras amostras ricas em catequina e epicatequina pode ser avaliada futuramente, bem como sua aplicação na análise de proantocianidinas totais após a despolimerização desses compostos.

Agradecimentos: Tiago Dias agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa de formação concedida (Processo 201410267000402).

Conformidade com as normas éticas

Conflito de interesses: Tiago Dias, Mara Reis Silva, Clarissa Damiani e Flávio Alves da Silva declaram que não têm conflito de interesse

Aprovação por comitês de ética: Este artigo não relata estudos com participantes humanos ou com animais, que tenham realizados por qualquer dos autores

Consentimento informado: Não se aplica

Referências

- Albarran G, Boggess W, Rassolov V, Schuler RH (2010) Absorption spectrum, mass spectrometric properties, and electronic structure of 1,2-benzoquinone. *J Phys Chem A* 114:7470–7478
- AOAC International (1998) AOAC official method 931.04 - moisture in cacao products: gravimetric method. In: Cunniff P (ed) Official methods of analysis of AOAC International. March 1998, 16th edn. AOAC International, Arlington
- AOAC International (2013) AOAC SMPR 2012.001: Standard method performance requirements for flavanols in foods and beverages. *J AOAC Int* 96:699
- Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM (2004) Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J Agric Food Chem* 52:1124–1131
- Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM (2014) USDA database for the flavonoid content of selected foods: release 3.1. (December 2013). Slightly revised, May 2014. <http://goo.gl/Lgd7n4>. Accessed 8 April 2015
- Bittencourt LS, Machado DC, Machado MM, et al. (2013) The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem Toxicol* 53:119–125
- Chin E, Miller KB, Payne MJ, Hurst WJ, Stuart DA (2013) Comparison of antioxidant activity and flavanol content of cacao beans processed by modern and traditional Mesoamerican methods. *Herit Sci* 1:9
- Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M, del Castillo MD (2012) Browning reactions. In: Simpson BK (ed) Food biochemistry and food processing, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp 56–83
- Duarte LT, Tiba JB, Santiago MF, Garcia TA, Freitas Bara MT (2012) Production and characterization of tyrosinase activity in *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 crude extract. *Braz J Microbiol* 43:21–29
- Eudey TL (2007) Designing experiments for validation of quantitative methods. In: Torbeck LD (ed) Pharmaceutical and medical device validation by experimental design. Informa Healthcare, Nova Iorque, pp 1–46
- Faccio G (2011) Discovery of oxidative enzymes for food engineering: tyrosinase and sulfhydryl oxidase. VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo
- Gadkari PV, Balaraman M (2015) Catechins: sources, extraction and encapsulation: a review. *Food Bioprod. Process.* 93:122–138
- García-Molina F, Muñoz JL, Varón R, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, Tudela J (2007) A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J Agric Food Chem* 55:9739–9749
- Gotti R, Furlanetto S, Pinzauti S, Cavrini V (2006) Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 1112:345–352
- Harkensee D, Beutel S, Young M, Ulber R (2006) Development of a fast spectroscopic enzyme assay for on-site measurement of total polyphenol content in grapes and wine. *Anal. Bioanal. Chem.* 384:1013–1018
- Hellström JK, Mattila PH (2008) HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *J Agric Food Chem* 56:7617–7624
- Hummer W, Schreier P (2008) Analysis of proanthocyanidins. *Mol Nutr Food Res* 52:1381–1398
- Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 126:1821–1835

- Ioniță E, Aprodu I, Stănciuc N, Râpeanu G, Bahrim G (2014) Advances in structure-function relationships of tyrosinase from *Agaricus bisporus* - investigation on heat-induced conformational changes. *Food Chem* 156:129–136
- Kanteev M, Goldfeder M, Fishman A (2015) Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci* 24:1360–1369
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18:2328–2375
- Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R (2007) Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *Eur Food Res Technol* 225:569–577
- Machonis P, Jones M, Schaneberg B, Kwik-Urbe C, Dowell D (2014) Method for the determination of catechin and epicatechin enantiomers in cocoa-based ingredients and products by high-performance liquid chromatography: first action 2013.04. *J AOAC Int* 97:506–509
- Majhenič L, Škerget M, Knez Ž (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem* 104:1258–1268
- Makkar HP, Gamble G, Becker K (1999) Limitation of the butanol–hydrochloric acid–iron assay for bound condensed tannins. *Food Chem* 66:129–133
- Marques LLM, Panizzon GP, Aguiar BAA, et al. (2016) Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chem* 212:703–711
- Mosca L, Marco C de, Visioli F, Cannella C (2000) Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *J Agric Food Chem* 48:297–301
- Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE (2010) Andando na superfície de resposta. In: Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE (eds) *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4a. edição. Bookman, Porto Alegre, pp 251–300
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, et al. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 2010:Article ID bap024
- Orhan I, Khan M (2014) Flavonoid derivatives as potent tyrosinase inhibitors – a survey of recent findings between 2008–2013. *Curr. Top. Med. Chem.* 14:1486–1493
- Parkin KL (2010) Enzimas. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR (eds) *Química de alimentos de Fennema*, 4th edn. Artmed, Porto Alegre, pp 263–342
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Saura-Calixto F (2009) Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: an approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Res. Int.* 42:1381–1388
- Prehn R, Gonzalo-Ruiz J, Cortina-Puig M (2012) Electrochemical detection of polyphenolic compounds in foods and beverages. *Curr. Anal. Chem.* 8:472–484
- Roleira FMF, Tavares-da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, Borges F (2015) Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem* 183:235–258
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem* 51:571–581
- Sigma-Aldrich (1998) Enzymatic assay of tyrosinase: polyphenol oxidase activity. <https://goo.gl/obrZIo>. Accessed 7 January 2015
- Sigma-Aldrich (2006) Tyrosinase from mushroom: product information. <http://goo.gl/b2Iup9>. Accessed 17 January 2015

Singleton VL, Rossi Junior JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144–158

Tarascou I, Souquet JM, Mazauric JP, et al. (2010) The hidden face of food phenolic composition. *Arch Biochem Biophys* 501:16–22

Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2:1231–1246

Vuong QV, Golding JB, Nguyen M, Roach PD (2010) Extraction and isolation of catechins from tea. *J Sep Sci* 33:3415–3428

Weber F, Schulze-Kaysers N, Schieber A (2014) Characterization and quantification of polyphenols in fruits. In: Watson RR (ed) *Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation*. Academic Press, Amsterdam, pp 293–304

Yonekura L, Martins CA, Sampaio GR, et al. (2016) Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. *Food Funct* 7:2970–2978

Zaidi KU, Ali AS, Ali SA (2014) Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Res* 2014:Article ID 120739

Zamora-Ros R, Forouhi NG, Sharp SJ, et al. (2014) Dietary intakes of individual flavanols and flavonols are inversely associated with incident type 2 diabetes in European populations. *J. Nutr.* 144:335–343

Zhou Y-L, Liu J, Ye Q-X, Zhao Z-M, Zhu L-P, Wang D-M (2014) Inhibitory activities of different theaflavins against tyrosinase. *Food Science and Technology* 39:169–172

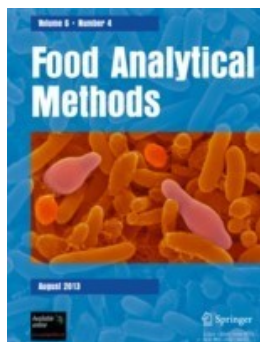
ANEXO – Normas para publicação na revista Food Analytical Methods



www.springer.com

Food Science & Nutrition

Home > Food Science & Nutrition



Food Analytical Methods

Editor-in-Chief: David Rodríguez-Lázaro

ISSN: 1936-9751 (print version)

ISSN: 1936-976X (electronic version)

Journal no. 12161



Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Original research, Reviews, and Brief communications.

Please note that a single blind review is used for this journal.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

You may upload your manuscript as a single PDF file with all tables and figures inserted/imported.

Please note that PDF files cannot be used for production of the accepted manuscript and source files are required at that stage.

Also, please follow these guidelines for your submissions:

- Each paper should have a separate “Conclusions” section, and any citations (such as reference citations, table or figures) is not allowed in this section.
- A complete sentence should not be used as the title of the paper.
- Manuscripts should be in 1.5 or double line spaces, and tables and figures should not be embedded within the text, instead they should be at the end of the manuscript.
- Reference citation should be in (Authors, Year) format.
- Manuscripts should be clear from any track-editing or comments.
- Manuscripts should not contain any supplementary materials.
- Manuscripts should not contain specific sections that are required by other journals (but not for this journal), such as “highlights”, “Practical Applications”.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

MANUSCRIPT ORGANIZATION

The text should be double spaced and page numbered to facilitate the reviewing process and should be structured as follows:

Main text

- Introduction
- Materials and methods, including if appropriate an area description, quality assurances etc.
- Results
- Discussion
- Conclusions
- Acknowledgements (if appropriate)
- References
- Tables
- Figure Captions

Text formatting

- Use a normal plain font (e.g. 10 point Arial or Times Roman)
- Use Italics for emphasis
- Use automatic page numbering
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar

Formulae

Use the equation editor for equations. Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor instead.

Footnotes

We discourage the use of footnotes. In most cases they can be incorporated in the main text.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Language

If English is not your native language you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for

publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment. Springer authors get special rates.

[Edanz Editing Global](#)

SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi:10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see: [ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

TABLES

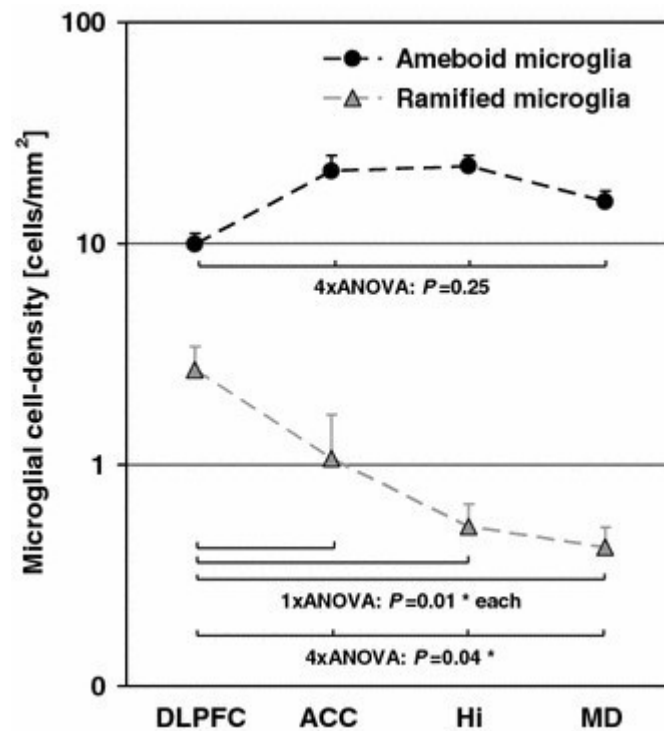
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

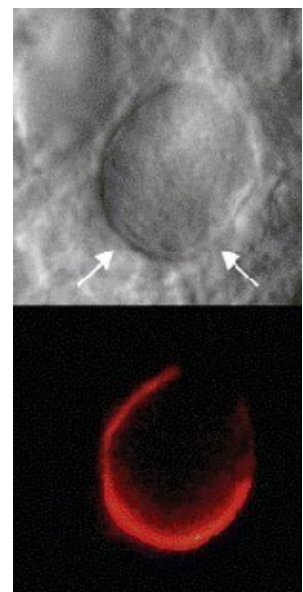
Line Art



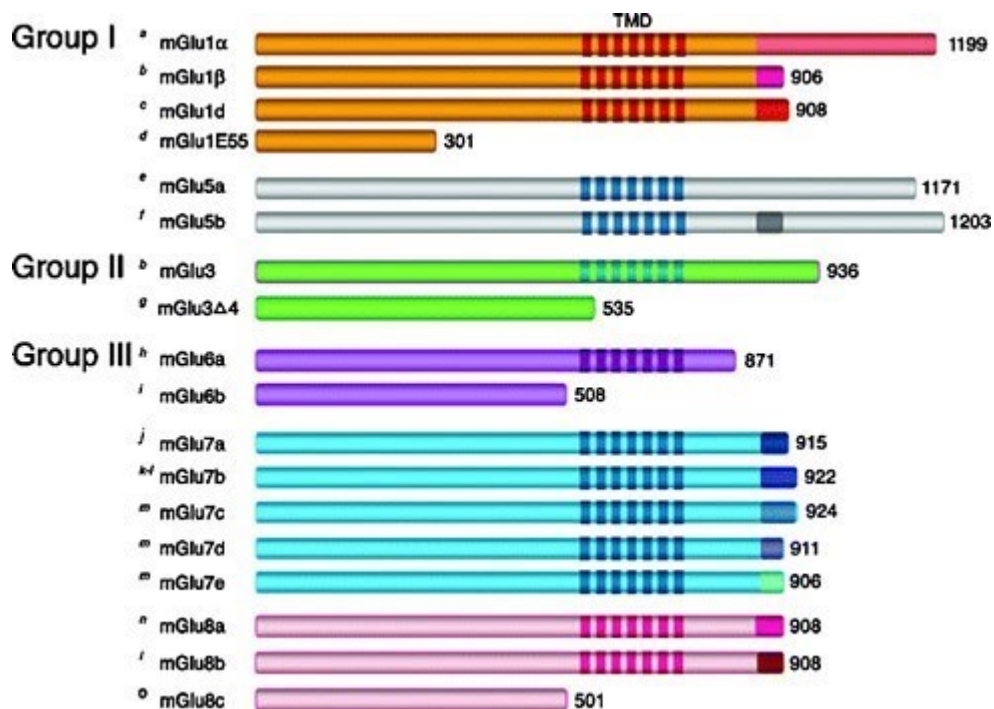
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,
- "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information

- (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author’s institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could influence or bias the work. Although an author may not feel there are conflicts, disclosure of relationships and interests affords a more transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of real or perceived conflicts of interests is a perspective to which the readers are entitled and is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal

relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. (Please note that each author should complete a disclosure form.)

Examples of forms can be found [here](#).

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: Author A, Author B, and Author C declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For

example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos espectrofotométricos são práticos para análise de compostos fenólicos, presentes nos alimentos, entretanto, assim com as demais ferramentas analíticas, esses métodos estão sujeitos a limitações relacionadas à possibilidade interferência com outros compostos e à dificuldade de detectar concentrações baixas dos analitos. Nas análises cromatográficas, mais modernas, essas limitações são menores, mas existentes.

A metodologia desenvolvida neste trabalho, para quantificação de catequina e epicatequina em alimentos, possibilitou minimizar, pelo menos uma das limitações, presentes nos métodos espectrofotométricos para análise dessas substâncias. No método desenvolvido, a interferência com outros compostos foi minimizada, utilizando duas estratégias: a purificação dos extratos, utilizando a técnica de extração em fase sólida e a derivatização da catequina e da epicatequina, pela tirosinase. O método possibilitou a detecção de catequina e epicatequina, de forma mais seletiva, por espectrofotometria, em amostras ricas nestas substâncias, como o guaraná e o cacau. A principal limitação do método, entretanto, está relacionada aos baixos teores de catequina e epicatequina nos alimentos e à possibilidade dessas substâncias oxidarem antes da análise.

O método desenvolvido precisa ser aperfeiçoado, para alcançar limites de quantificação menores e, possivelmente, ser aplicado em alimentos contendo teores mais baixos de catequina e epicatequina.

A contribuição deste trabalho, na área, é modesta, mas importante, visto que o uso de tirosinase em aplicações analíticas tem aumentado nos últimos anos, mas, ainda há poucas informações sobre o uso dessa enzima em aplicações analíticas práticas, como os métodos espectrofotométricos para análises em alimentos.

Os estudos realizados neste trabalho, sobre as condições da oxidação de catequina e epicatequina, pela tirosinase, somam-se aos de outros autores e podem incentivar novos estudos, para aprimorar o método, no sentido de aumentar a sua exatidão e de alcançar limites de quantificação menores, aumentando, assim, sua aplicabilidade.