



Desenvolvimento de uma metodologia colorimétrica para determinação de compostos fenólicos em bebidas comerciais.

MARIA EDUARDA SCHNEIDER

Julho de 2022

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**Desenvolvimento de uma metodologia colorimétrica para determinação de
compostos fenólicos em bebidas comerciais.**

“Dissertação submetida como requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química, área de especialização - Qualidade”

AUTORA

MARIA EDUARDA SCHNEIDER

ORIENTAÇÃO

DOUTORA FELISMINA T. C. MOREIRA

Coordenadora/ Investigadora BioMark Sensor Research

DOUTOR ABEL JOSÉ DUARTE

Professor adjunto / Investigador ISEP

JULHO 2022

AGRADECIMENTOS

É de facto muito gratificante olhar para a minha trajetória não só pessoal como profissional/académica e me sentir bastante grata por todo o percurso e todas as pessoas que de alguma maneira fizeram parte do meu crescimento. É impossível reconhecer todos os professores, colegas e amigos individualmente que contribuíram para a minha permanência em Portugal e tornaram todos os desafios mais leves.

É com profunda gratidão que agradeço ao departamento de Engenharia Química do ISEP por toda orientação e apoio durante a minha trajetória desde a troca de Universidade até a então finalização do mestrado.

Agradeço à Dr^a. Felismina Moreira, por ter acreditado no meu potencial e ter dado a oportunidade de eu integrar um grupo como o BioMark ISEP. Obrigada por ter aceite orientar a minha tese de mestrado e permitido a realização deste trabalho nas instalações do laboratório.

Agradeço ao Engenheiro Abel José Duarte, pela sua orientação, atenção e apoio durante a realização deste trabalho.

Um muito obrigada as colegas do BioMark pela ajuda e companheirismo.

Uma enorme gratidão aos meus pais e avós, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigada por sempre acreditarem em mim e apoiarem meus sonhos e objetivos, por mais que os mesmos fossem do outro lado do oceano e a saudade fosse difícil.

E por fim, um agradecimento especial ao João Alves, por ser presente na minha vida e ser um dos meus maiores motivadores diários. Obrigada por ser minha família e vivenciar comigo todas as alegrias e aflições de uma rotina de trabalhador-estudante.

RESUMO

A produção de radicais livres é um processo comum e necessário dos organismos vivos, e como consequência disso, os mesmos podem reagir e causar danos oxidativos que são responsáveis pelo envelhecimento e doenças degenerativas. De forma a combater estes efeitos o organismo consegue desenvolver defesas antioxidantes, porém algumas atitudes e hábitos podem ajudar nestes mecanismos de defesa. Sendo assim, uma dieta rica em compostos fenólicos pode ser de suma importância devido às suas propriedades antioxidantes. As frutas, vegetais e seus derivados são as principais fontes destes compostos. Além disso, os polifenóis também influenciam a qualidade dos produtos, pois atuam no processo de oxidação, tendo um papel importante na cor e evolução da sensação gustativa (adstringência). Sendo assim a determinação destes compostos é uma tarefa importante a fim de avaliar a potencial aplicação destes produtos como fonte de antioxidantes. O presente trabalho descreve a monitorização de polifenóis em bebidas comerciais disponíveis no mercado. A presença dos polifenóis traduz o potencial de inibição de processos de oxidação característico dessas bebidas. Esta medida foi efetuada por detecção ótica e permite estimar quantitativamente os teores de compostos fenólicos totais medidos pela atividade enzimática da Horseradish peroxidase (HRP) e uma enzima artificial de nanocubos de Azul de Prússia (NcAP).

Foi realizado um estudo para avaliar a linearidade e os limites de detecção para ambos os ensaios. Os resultados foram calculados com base em antioxidantes de referência. Neste trabalho utilizaram-se o ácido gálico (AG) e ácido tânico (AT). Em termos gerais, os NcAP mostraram ser eficientes na atividade mimética da peroxidase na reação típica de H_2O_2 e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). O mecanismo catalítico foi confirmado por análise colorimétrica.

Para o desenvolvimento da metodologia foram realizadas otimizações de temperatura, concentração, pH e tempo de reação. Com a enzima natural verificou-se que a melhor condição de reação foi 0,4 mM de TMB, 4,0 mM de H_2O_2 , 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de HRP, pH 4, temperatura ambiente e um tempo de reação de 2 minutos. Os compostos fenólicos foram detetados até níveis μM , com um LOD = 6,62 μM para ácido gálico (AG) e 0,41 μM para ácido tânico (AT). Os valores de R^2 de 0,9856 e 0,9912 para detecção de AG e AT, respetivamente, sugerem uma boa linearidade.

A mesma metodologia foi reproduzida com a enzima artificial, neste caso, NcAP. Foram otimizados parâmetros como o pH, temperatura e tempo de reação para um valor de concentração de NcAP de 0,01 µg/mL. Os compostos fenólicos foram também detetados em níveis µM com um LOD = 5,63 µM para AG e 1,51 µM para AT. Os valores de R^2 de 0,986 e 0,977 para detecção de AG e AT, respectivamente, sugerem uma boa linearidade.

Por fim, ambas as metodologias foram aplicadas na avaliação de compostos fenólicos em bebidas comerciais. Os resultados através da metodologia com HRP sugerem resultados próximos para os diferentes antioxidantes analisados, por outro lado, os resultados com NcAP apresentam algumas discrepâncias. No entanto, apesar dos resultados obtidos serem promissores, podemos concluir que a etapa de análise de amostras reais com a metodologia NcAP ainda carece de otimizações para seguimento em trabalhos futuros.

Palavras-chaves: Detecção colorimétrica; Compostos fenólicos; peroxidase; Nanoenzimas.

ABSTRACT

The production of free radicals is a common and necessary process of living organisms, and consequently, they can react and cause oxidative damage that is responsible for aging and degenerative diseases. To combat these effects, the body can develop antioxidant defenses, but some attitudes and habits can help in these defense mechanisms. Thus, a diet rich in phenolic compounds can be of paramount importance due to their antioxidant properties, fruits, vegetables, and their derivatives are the main sources of these compounds. In addition, polyphenols also influence the quality of the products, as they act in the oxidation process, playing an important role in the color and evolution of the taste (astringency). Therefore, the determination of these compounds is an important task to evaluate the potential application of these products as a source of antioxidants.

The goal of this work was to develop a colorimetric enzymatic methodology for the determination of phenolic compounds present in commercial beverages and to reproduce this methodology with the use of an artificial enzyme that mimics the activity of peroxidase since the mimetic enzymes are of scientific and practical significance as they present greater stability and low cost. Here it was reported that Prussian blue nanocubes (NcAP) exhibited interesting peroxidase-like activity in the typical reaction of H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).

For the development of the methodology, optimizations of temperature, concentration, pH, and reaction time were performed. With the natural enzyme, it was found that the best reaction condition was 0,4 mM of TMB, 4,0 mM of H_2O_2 , 0,03 $\mu\text{g/mL}$ of HRP, pH 4, room temperature, and a reaction time of 2 minutes. Phenolic compounds were detected up to μM levels, with a LOD = 6,62 μM for gallic acid (AG) and 0,41 μM for tannic acid (AT). R^2 values of 0,9856 and 0,9912 for detection of AG and AT, respectively, suggest good linearity.

The same methodology was reproduced with artificial enzyme, in this case, NcAP, where optimizations of the conditions were also performed, but the only change was in the concentration of the nanoenzyme, which in this case was 0,01 $\mu\text{g/mL}$. Phenolic compounds were also detected at μM levels with a LOD = 5,63 μM for AG and 1,51 μM

for AT. R^2 values of 0,9861 and 0,9769 for detection of AG and AT, respectively, suggest good linearity.

Finally, both systems were used in the evaluation of phenolic compounds in commercial beverages. The results through the methodology with HRP suggest similar results for the different antioxidants analyzed, whereas the results with NcAP show discrepancies. Therefore, despite promising results, the analysis of real samples with the NcAP methodology still needs optimizations for follow-up in future works.

KeyWords: Colorimetric detection; Phenolic compounds; Peroxidase; Nanoenzymes

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	- 1 -
1.1. Bebidas e benefícios para a saúde humana	- 1 -
Vinho e sumo de uva	- 1 -
Chá verde.....	- 2 -
Sumo de maçã.....	- 4 -
Cervejas	- 4 -
Águas aromatizadas	- 5 -
1.2. Stress oxidativo	- 5 -
1.2.1. Espécies oxidativas de oxigénio	- 7 -
1.2.2. Defesas antioxidantes.....	- 8 -
1.3. Compostos Fenólicos.....	- 9 -
1.3.1. Compostos flavonóides	- 10 -
1.3.2. Compostos não flavonóides.....	- 13 -
- Ácido gálico	- 14 -
- Ácido tânico.....	- 14 -
1.4. Metodologias de análise de compostos fenólicos	- 15 -
1.4.1. Métodos espectrofotométricos.....	- 15 -
- Métodos Folin-Ciocalteu	- 16 -
- Método Vanilina	- 17 -
1.4.2. Métodos Cromatográficos	- 18 -
1.4.3. Método tiras colorimétricas	- 19 -
1.6 Enzimas	- 21 -
- Peroxidases.....	- 21 -
- Enzima artificial - NcAP.....	- 25 -
2.DESCRICÇÃO EXPERIMENTAL	- 27 -
2.1. Equipamento e materiais.....	- 27 -
2.2. Reagentes e soluções	- 28 -
- Amostras	- 28 -
2.3. Procedimentos experimentais	- 29 -
2.3.1 Síntese NcAP	- 29 -
2.3.2. Metodologia para determinação colorimétrica de compostos fenólicos – HRP	- 30 -
2.3.3. Atividade mimética da peroxidase dos NcAP	- 31 -
2.3.4. Metodologia para determinação colorimétrica de compostos fenólicos utilizando enzima artificial NcAP	- 31 -

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 32 -
3.1. Otimização das condições da reação com HRP	- 32 -
3.2 Determinação colorimétrica de compostos fenólicos - HRP	- 34 -
3.4 Determinação colorimétrica de compostos fenólicos - NcAP	- 38 -
3.5. Análise de amostras reais pelos métodos de HRP e NcAP	- 41 -
4. CONCLUSÕES	- 44 -
5.REFERÊNCIAS.....	- 46 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Principais classificações dos compostos fenólicos, com exemplos para grupos mais estudados. Adaptado de [23].	- 10 -
Figura 1.2 - Estrutura característica de um composto Flavonóide, com indicações dos anéis aromáticos A, B e C e respectivas numerações das posições dos carbonos da estrutura [31].	- 10 -
Figura 1.3 - Estruturas químicas dos ácidos fenólicos - ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos [33].	- 13 -
Figura 1.4 - Estrutura química do ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico)[34].	- 14 -
Figura 1.5 - Estrutura química do ácido tânico [40].	- 15 -
Figura 1.6 - Reação do método Folin-Ciocalteu e respectivas colorações formadas com a variações de intensidade conforme presença de polifenóis. Adaptado de [45].	- 17 -
Figura 1.7 - Dispositivo para avaliação simultânea de atividade antioxidante e conteúdo fenólico total em tiras de papel colorimétrica conforme descrito em [54].	- 21 -
Figura 1.8 – Representação tridimensional da estrutura da HRP, neste caso o grupo heme é representado pela estrutura vermelha entre moléculas de cálcio (esferas azuis) [57].	- 22 -
Figura 1.9 - Mecanismo do ciclo catalítico da HRP na presença do agente oxidante (H_2O_2), onde AH é o substrato redutor e o A^* o radical livre formado [55].	- 23 -
Figura 1.10 – Produtos intermediários da oxidação o TMB formados após a oxidação da HRP, podendo ser formada uma coloração azul (652 nm) ou amarelada (450 nm) [59].	- 24 -
Figura 1.11 - Esquema da reação de oxidação do TMB pela peroxidase na presença do peróxido de hidrogénio formando uma coloração azul forte, que com a presença de compostos fenólicos sofre inibição permitindo a deteção dos mesmos. Adaptado de [60].	- 25 -
Figura 1.12 - Reação da nanoenzima tipo AP mimetizando HRP. Adaptado de [61].	- 26 -
Figura 2.13 - Espectrofotómetro UV-Vis da marca Thermo Scientific, modelo Evolution 220.	- 27 -
Figura 2.14 - Bebidas comerciais utilizadas para avaliação dos compostos fenólicos.	- 28 -

Figura 2.15 - Imagens MEV (A) biografeno e (B) óxido de grafeno modificado com NcAP.....	30 -
Figura 3.16 – Cuvetes resultantes da avaliação inicial das condições ótimas para reação de oxidação do TMB catalisada através da enzima HRP. Sendo A solução com HRP [0,01 µg/mL] e absorvância de 0,06 u.a; B solução com HRP [0,005 µg/mL] e absorvância de 0,04 u.a, e C solução com HRP [0,0025 µg/mL] e absorvância de 0,03 u.a.....	32 -
Figura 3.17 - Avaliação da absorvância da reação de oxidação do TMB (400 µM de TMB; 4,0 mM de H ₂ O ₂ e 0,03 µg/mL de HRP) em relação ao tempo, para determinação do tempo ideal de reação.....	33 -
Figura 3.18 - Cuvetes de avaliação da reação em relação ao tempo, acima de 2 minutos com formação de particulados.....	34 -
Figura 3.19 - Espectro de absorção (A) para reação com HRP e AG, e curva de calibração (B) para a determinação colorimétrica de AT entre 10 - 50 µM.....	35 -
Figura 3.20 - Espectro de absorção (A) para reação com HRP e AT, e curva de calibração (B) para a determinação colorimétrica de AT entre 0,5 – 4,5 µM.	36 -
Figura 3.21 - Representação visual da cuvete dos diferentes sistemas de reação: (A) PBS (buffer) + NcAP + H ₂ O ₂ + TMB; (B) PBS + NcAP + TMB; (C) PBS + H ₂ O ₂ + TMB; (D) PBS + TMB.....	37 -
Figura 3.22 - Espectro de absorção (A) para reação com NcAP e AG, e gráfico de calibração linear (B) para a determinação colorimétrica de AG de 10-40 µM.....	39 -
Figura 3.23 - Espectro de absorção (A) para reação com NcAP e AT, e gráfico de calibração linear (B) para a determinação colorimétrica de AG de 1-9 µM.....	40 -
Figura 3.24 – Resultado dos teores de compostos fenólicos avaliados pelo método HRP em teores de ácido gálico (mg (ácido gálico)/L)[barras azuis]; e teores equivalentes a ácido tânico (mg (ácido tânico)/L) [barras laranjas] para diferentes bebidas comerciais com erros de três medições independentes, sendo A – Sumo de maçã; B – Água aromatizada; C – Cerveja; D – Vinho branco; E – Vinho tinto e F – Chá verde.	42 -
Figura 3.25 – Resultado dos teores de compostos fenólicos avaliados pelo método NcAP em teores de ácido gálico (mg (ácido gálico)/L)[barras azuis]; e teores equivalentes a ácido tânico (mg (ácido tânico)/L) [barras laranjas] para diferentes bebidas comerciais com erros de três medições independentes, sendo A – Sumo de maçã; B – Água aromatizada; C – Cerveja; D – Vinho branco; E – Vinho tinto e F – Chá verde.	43 -

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Teor de compostos fenólicos em específicas amostras de vinhos de diferentes países, chá verde (2 marcas diferentes) e sumos de uva [14].....	3 -
Tabela 1.2 - Exemplos de doenças relacionadas com o stress oxidativo [26].....	6 -
Tabela 1.3 - Principais espécies reativas de oxigénio [24].....	7 -
Tabela 1.4 - Diferentes subgrupos dos compostos fenólicos flavonóides e alguns exemplos para cada um dos grupos. Adaptado de [32].....	12 -
Tabela 1.5 - Exemplos de procedimentos de HPLC para determinação de polifenóis em diferentes amostras.....	19 -

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RL – Radicais livres

AO - Antioxidante

ER – Espécies reativas

EROs – Espécies reativas de oxigênio

SOD - superóxido dismutase

GSH - glutathione

FC – Folin-Ciocalteu

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho

MBTH - Hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona

AG – Ácido Gálico

AT – Ácido Tânico

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

HRP – *Horseradish peroxidase*

AP – Azul de Prússia

PI – Ponto isoelétrico

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

ABTS - 2,2'-azino-di(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico)

NcAP – Nanocubos de azul de prússia

1.INTRODUÇÃO

1.1. Bebidas e benefícios para a saúde humana

Nos últimos anos o mercado de alimentos saudáveis tem vindo a crescer por consequência das tendências de hábitos saudáveis por parte dos consumidores [1]. Muitas destas tendências estão relacionadas com a procura de soluções relativamente aos problemas de saúde causados em organismos em stress oxidativo, onde os radicais livres (RL) formados podem causar danos as (bio)moléculas e consequentemente causar patologias como doenças vasculares, cancro e doenças autoimunes. Sendo assim, pesquisas confirmam que alimentos como vegetais, frutas e outros, possuem efeito antioxidante (AO) sobre os RL.

Neste sentido, bebidas comerciais como vinhos, chás e sumos naturais são reconhecidas como fontes de AOs ao organismo que podem gerar benefícios para a saúde humana [2]. Estas fontes antioxidantes podem ser os polifenóis, que na maioria dos casos são benéficos para saúde, mas exigem um certo controlo, pois em excesso podem causar efeitos colaterais. Sendo assim, é de extrema importância analisar os teores de polifenóis em bebidas e produtos alimentares [3]. Além da importância de controlar esses compostos em decorrência de um futuro impacto na saúde dos consumidores, os mesmos apresentam um papel fundamental na cor, aroma e sabor das bebidas, sendo então o teor de compostos fenólicos totais um índice de avaliação importante para a qualidade desses produtos [4].

Vinho e sumo de uva

O vinho é uma bebida alcoólica obtida a partir da fermentação da uva fresca e madura. Dentro da União Europeia o vinho é definido legalmente como um produto obtido exclusivamente pela fermentação parcial ou total de uvas frescas, inteiras ou esmagadas. Os vinhos apresentam diferentes tipos de classificação, podendo ser: tinto, branco, rosé e espumantes. Os mais comuns, os vinhos tintos, são obtidos a partir de uvas tintas ou de uvas que apresentam polpa com pigmentação escura. Já os vinhos brancos podem ser obtidos a partir de uvas brancas ou até mesmo de uvas tintas desde que ocorra a retirada da casca no processo de fabricação e a polpa não apresente coloração escura [5]–[9]. Em Portugal, o vinho é considerado um produto de referência com uma grande

carga histórica acumulada e de alto consumo, os portugueses no ano de 2020/2021 consumiram em média por habitante 52,1 L [10].

Os vinhos apresentam altos teores de compostos fenólicos, os quais têm propriedades AOs associadas que apresentam benefícios à saúde humana e além disso também são responsáveis pela cor, estrutura e adstringência dos vinhos. Estes compostos estão presentes principalmente nas uvas e os seus teores podem variar de acordo com a espécie, maturidade, condição climática e tipo de cultivo. Também variam em distribuição nas diferentes partes do fruto, podendo estar nas grainhas, polpa, película e casca com diferentes quantidades. As uvas apresentam diferentes tipos de compostos fenólicos na sua composição. Estes compostos têm implicação nos fenómenos de oxidação e apresentam um papel importante na cor (acastanhamento) e evolução do gosto (modificação da adstringência) [5], [6], [8].

O consumo de sumo de uva também é uma opção para os consumidores que procuram alternativas para uma vida saudável. Por ser uma bebida obtida do mosto simples de uvas frescas, o sumo de uva também é fonte de compostos fenólicos e apresenta características semelhantes ao vinho, porém com uma vantagem pelo fato de não apresentar álcool na sua fórmula, o que permite assim o consumo por crianças e pessoas que não podem ingerir álcool [5], [8].

Chá verde

O chá é a segunda bebida mais consumida a nível mundial, ficando atrás apenas da água [11]. O chá verde apresenta destaque de rendimento de produção em relação aos demais tipos de chás existentes. Esse tipo de chá é obtido a partir de folhas da planta *C.sinensis*, as quais são submetidas a um processo de secagem para inibir as enzimas polimerizantes presentes e evitar variações/perdas do conteúdo fenólico. Sendo assim é um tipo de chá pouco processado, o que também auxilia no controlo dos teores dos AOs [4], [12], [13].

As propriedades químicas do chá, que determinam principalmente as propriedades sensoriais como sabor, aroma e qualidade são dependentes dos teores de compostos fenólicos. O chá verde é rico em polifenóis, sendo predominante a presença de catequinas [4].

O teor de compostos fenólicos presente em uma bebida é dependente da composição da mesma, porém para um mesmo tipo de bebida, com os mesmos compostos podem ocorrer variações, uma vez que outros fatores como o cultivo de matéria-prima e condições ambientais também influenciam nos teores de polifenóis. Sendo assim, a tabela 1.1 apresenta diferentes valores de conteúdo fenólico para vinhos, chás e sumos do mesmo tipo, porém de diferentes regiões evidenciando as diferenças que ocorrem provavelmente pelos fatos citados anteriormente [14].

Tabela 1.1 - Teor de compostos fenólicos em específicas amostras de vinhos de diferentes países, chá verde (2 marcas diferentes) e sumos de uva [14].

BEBIDA	Teor de compostos fenólicos totais
Vinho tinto (Portugal) ^a	1615
Vinho tinto (Italia) ^a	3314-4177
Vinho tinto (Brasil) ^a	1947-1984
Vinho branco (Brasil) ^a	256-353
Vinho branco (Italia) ^a	439-854
Vinho branco (Argentina) ^a	216
Chá verde ^b	65,8-106,2
Chá verde ^b	61-200
Sumo uva (tinto) ^a	1728
Sumo de uva (branco) ^a	519

^a – mg equivalente de ácido gálico/L

^b – mg equivalente de ácido gálico/g matéria seca

Sumo de maçã

A presença de polifenóis na maçã pode ser comprovada através da coloração escura formada na superfície da mesma depois de cortada. Essa coloração é resultado da reação destes compostos com o ar. A maçã no geral é um alimento rico em fibras, vitaminas e minerais e os principais compostos fenólicos presentes na sua composição são os taninos e os flavonóides, presentes em maior teor na casca. Sendo assim o melhor sumo seria o que apresenta presença de polpa, pois teoricamente teria maior teor de AOs. Além disso, de modo geral, o teor de polifenóis presentes em sumos de frutas depende da composição e processamento [15-16].

Cervejas

A cerveja é considerada uma das bebidas mais antigas, uma vez que existem evidências históricas da sua produção desde os primeiros registos das civilizações. A cerveja é basicamente produzida com leveduras, que são micro-organismos responsáveis por transformar os açúcares presentes em álcool e CO₂, ou seja, pela fermentação. O lúpulo é responsável pelo amargor e as notas aromáticas (muitas variações), além disso também é responsável por uma parte dos antioxidantes presentes na cerveja. Outro ingrediente importante das cervejas é o malte, ou seja, os grãos utilizados na fabricação da cerveja. Geralmente são grãos de cevada, mas também são muito utilizados trigo e centeio. Esses grãos são maltados e torrados na maioria das vezes, o malte consiste em induzir a germinação do grão para que aumente a disponibilidade dos açúcares presentes. Estes processos influenciam na cor e sabor da cerveja. Outro componente é a água, que representa a maior parte da composição desta bebida, entre 90-95%. As propriedades da água (p.e. dureza e pH) podem influenciar no sabor, cor e amargor, variando assim o tipo de cerveja a ser produzido [17-18].

A cerveja, assim como os vinhos, apresenta benefícios para a saúde, desde que consumida de forma moderada. Os efeitos positivos geralmente estão relacionados com a presença de AOs, uma vez que a cevada, comumente utilizada, é rica em polifenóis. A sociedade europeia de cardiologia indica que as cervejas são ricas em vitaminas do complexo B que apresentam diversas atuações no corpo e auxiliam no equilíbrio do metabolismo. Há evidências de que o consumo de cerveja do tipo artesanal é melhor para a redução de incidência de doenças cardíacas e diabetes em comparação com as cervejas

tradicionais, isso é explicado uma vez que este tipo de cerveja apresenta um processo produtivo com algumas etapas a menos, como filtração e pasteurização, o que permite uma maior concentração de compostos vegetais, leveduras e bactérias benéficas à saúde [19-20].

Águas aromatizadas

Como resposta à procura de produtos mais naturais e saudáveis, uma alternativa do mercado para consumidores que querem evitar refrigerantes são as águas saborizadas. Esse tipo de bebida é classificado como refrescante e combina a hidratação da água com frescor e nutrientes de frutas/condimentos. O mercado aposta que esse produto é a melhor opção para pessoas que apresentam dificuldades em beber água pura no dia a dia. A portaria 703/96 de 6 de dezembro classifica água aromatizada como um refrigerante que resulta da mistura em água de aromatizantes, porém sem a presença de açúcares e edulcorantes [21].

Existem diferentes receitas e combinações para este tipo de bebida, podendo a mesma ser realizada de maneira caseira. Industrialmente há misturas que chegam a conter até 12 % de sumo de fruta presente na composição, geralmente os principais compostos adicionados são os aromas, reguladores de acidez, acidificantes, conservantes e vitaminas [22].

1.2. Stress oxidativo

O corpo humano apresenta mecanismos para manter o equilíbrio entre a produção de RL e defesas antioxidantes para remover espécies ativas de oxigénio, estes mecanismos são fundamentais para o pleno funcionamento do organismo. Quando as espécies de oxigénio ativo ou RL são gerados em maior quantidade, deixa de haver equilíbrio e afirma-se que o organismo está em estado de stress oxidativo [5][6].

É comum em organismos aeróbios a formação de RL, que são espécies com eletrões desemparelhados que aumentam a reatividade química do átomo ou molécula, principalmente em formas reativas de oxigénio (ER), porém a maior parte destes compostos são removidos pela defesa antioxidante da célula. Estes subprodutos de oxigénio nem sempre configuram uma ameaça aos organismos em concentrações baixas ou moderadas, são fundamentais no funcionamento e manutenção do equilíbrio do organismo [23]–[25]. O estado de stress oxidativo pode ocorrer por meios naturais

(atividade física exagerada ou processos de inflamação), ou causas não naturais como tabagismo e alcoolismo, hábitos que são relacionados com a formação exagerada de RL. Na tabela 1.2 são apresentados diferentes tipos de doenças e sua relação com a formação da ER. O envelhecimento também é associado a produção em excesso de ERs [23].

Tabela 1.2 - Exemplos de doenças relacionadas com o stress oxidativo [26].

DOENÇA	Natureza do envolvimento com ER
• Aterosclerose, síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Kwarshiokor, Doença de Keshan • Doença de Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, CCL₄ etc. • Doença de Alzheimer, asma, artrite reumatóide, asbestose, síndrome de insuficiência respiratória do adulto • Esclerose múltipla • Doença granulomatosa crônica • Diabetes mellitus, anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclâmpsia • Hipertensão arterial sistêmica • Hemocromatose idiopática, talassemia, anemia falciforme, doença de Wilson • Doença granulomatosa crônica, deficiência de enzimas antioxidantes.	• Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes. • Uso de drogas e toxinas. Na doença de Parkinson as toxinas produzidas estariam envolvidas com a produção de RL. • Produção de O₂^{•-}, H₂O₂ e HClO por células fagocíticas ativadas. • Perturbação estrutural da célula. As hemácias tornam-se mais suscetíveis à ação dos radicais livres. • Defeito genético no sistema antioxidante. • Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigênio. • Produção de O₂^{•-} por NADPH/NADP oxidase. • Transferência de electrões ao oxigénio por metais de transição. • Defeito genético no sistema antioxidante, especificamente o sistema NADPH oxidase.

É notável a importância da manutenção do equilíbrio do organismo, para evitar que ocorra o stress oxidativo, uma vez que 70 % das doenças crónicas e todos problemas associados às mesmas podem ser evitadas. O controlo da produção excessiva de EROs pode ser realizado com níveis adequados de antioxidantes no organismo, que podem ser

obtidos com uma melhoria na qualidade na alimentação, ou evitando comportamentos que facilitam a produção destas espécies, como o tabaco ou exposição excessiva a poluentes ambientais [24]–[26].

1.2.1. Espécies oxidativas de oxigénio

Os sistemas biológicos para apresentarem um bom funcionamento necessitam da formação de radicais livres. Existem diferentes espécies reativas que variam conforme o átomo energético, compostos reativos de oxigénio, enxofre, cloro, nitrogénio e espécies reativas de metais de transição. A classe mais importante é de ER que derivam do oxigénio molecular, que apesar de ser fundamental para um ser aeróbio pode apresentar toxicidade em algumas condições. As principais ERs são apresentadas na tabela 3 [5][6][8].

Tabela 1.3 - Principais espécies reativas de oxigénio [24].

$O_2^{\cdot -}$	Superoxide radical
H_2O_2	Hydrogen peroxide
$HO^{\cdot}$	Hydroxyl radical
1O_2	Singlet oxygen
$HOO^{\cdot}$	Hydroperoxyl radical
$LOOH$	Alkylhydroperoxide
$LOO^{\cdot}$	Alkylperoxyl radical
$LO^{\cdot}$	Alkoxyl radical
ClO^-	Hypochlorite ion
$Fe^{4+}O$	Ferryl ion
$Fe^{5+}O$	Perferryl ion
$NO^{\cdot}$	Nitric oxide

Normalmente é na cadeia respiratória mitocondrial que ocorre a formação dos RLs, sendo assim é onde ocorre a formação do anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$), considerado uma ER primária. Neste caso ocorre a adição de um eletrão que reduz o O_2 causando a formação do anião que é relacionado com diferentes tipos de doenças. Apesar do $O_2^{\cdot -}$ não ser muito reativo, este anião pode realizar interação com outras moléculas e formar RL conhecidos como ERs secundárias, como peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$). O radical hidroxilo é o RL que apresenta maiores danos, pois consegue atacar o DNA [23], [26].

A mitocôndria além de ser onde ocorre a formação de RLs, também pode sofrer ataque dos mesmos apesar de ser um dos locais da célula com elevado teor de antioxidantes. As ERs formadas têm acesso aos lípidos presentes na membrana da célula

e onde ocorre a peroxidação lipídica. Esta peroxidação inicia-se com uma espécie reativa como o hidroxilo ou o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) retirando um átomo de hidrogénio da cadeia de um lípido (LH), formando assim um radical lipídico ($L\bullet$), seguido por uma ação de uma molécula de O_2 , formando radical peroxil ($LOO\bullet$). Uma vez não neutralizado pelas defesas do organismo ocorre o que é conhecido como propagação da peroxidação lipídica, que é a reação do radical peróxido com outros lípidos presentes formando lípidos hidroperóxidos ($LOOH$). Estes radicais podem causar danos superiores comparado com as EROs iniciais [23].

1.2.2. Defesas antioxidantes

Com a presença de RLs no organismo há necessidade de mecanismos de defesa para a eliminação dos mesmos. Estas defesas são os compostos antioxidantes, uma substância em baixa concentração que através da sua oxidação preferencial, retarda ou previne a oxidação de outras substâncias presentes no meio. Para garantir um bom funcionamento, um antioxidante deve ter, (i) potenciais substituintes doadores de eletrões ou radicais hidrogénio, (ii) capacidade de deslocamento do radical formado na estrutura e (iii) capacidade de quelar metais de transição e acesso ao local de ação [5][9].

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas de lípidos. Estas atuam diminuindo a concentração de oxigénio evitando a primeira fase do estado de oxidação, também podem atuar como quelantes de iões metálicos e decompondo produtos primários em compostos não radicais [5][9].

As defesas antioxidantes podem ser classificadas como enzimáticas ou não enzimáticas. As enzimáticas encontram-se em todo organismo, no meio intercelular e extracelular, exemplos destas defesas são a superóxido dismutase (SOD) que converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio, estes compostos depois são convertidos em água por outros dois exemplos de antioxidantes, a catálase e a glutathione peroxidase [5][9].

Os antioxidantes enzimáticos são formados por elementos que podem ser encontrados na alimentação, como a glutathione (GSH) que é um tripéptido de baixo peso molecular que atua como quelante de RLs. Outros exemplos são a vitamina E (α -

tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), carotenóides (vitamina A) e os flavonoides[5][9].

1.3. Compostos Fenólicos

Existem inúmeros compostos antioxidantes e os mesmos são classificados em grupos conforme suas características principais. Os fitoquímicos são compostos antioxidantes bioativos que podem ser encontrados nas plantas e derivados (sementes, vegetais, frutas, folhas, raízes, ervas, etc). Os compostos mais estudados desse grupo são os fenólicos, que apresentam uma fórmula química com pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais hidroxilo(s). Podem apresentar também outros grupos funcionais ligados ao anel aromático como ésteres, glicosídeos e metil ésteres [23], [27], [28].

Estes compostos não são estudados apenas pela sua capacidade antioxidante, mas também pela importância das suas propriedades relacionados com a qualidade de certos alimentos, podendo a sua presença apresentar influência na cor, gosto e aroma. Os compostos fenólicos apresentam diferentes tipos de classificação, porém a mais comum divide estes compostos em flavonóides e não flavonóides (Fig.1.1). Os flavonóides apresentam uma estrutura básica formada por $C_6-C_3-C_6$ e as subdivisões deste grupo resultam da variação do número e localização do grupo hidroxilo, como também a natureza da alquilação e/ou glicosilação destes grupos, basicamente compreende as espécies de flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides. Dentro dos não flavonóides há destaque para os ácidos fenólicos, que são divididos em dois grupos, o primeiro dos ácidos hidroxibenzóicos (C_6-C_1), que são os mais simples encontrados na natureza, e o segundo grupo que representa os ácidos hidroxicinâmicos com uma estrutura C_6-C_3 [28]–[30].

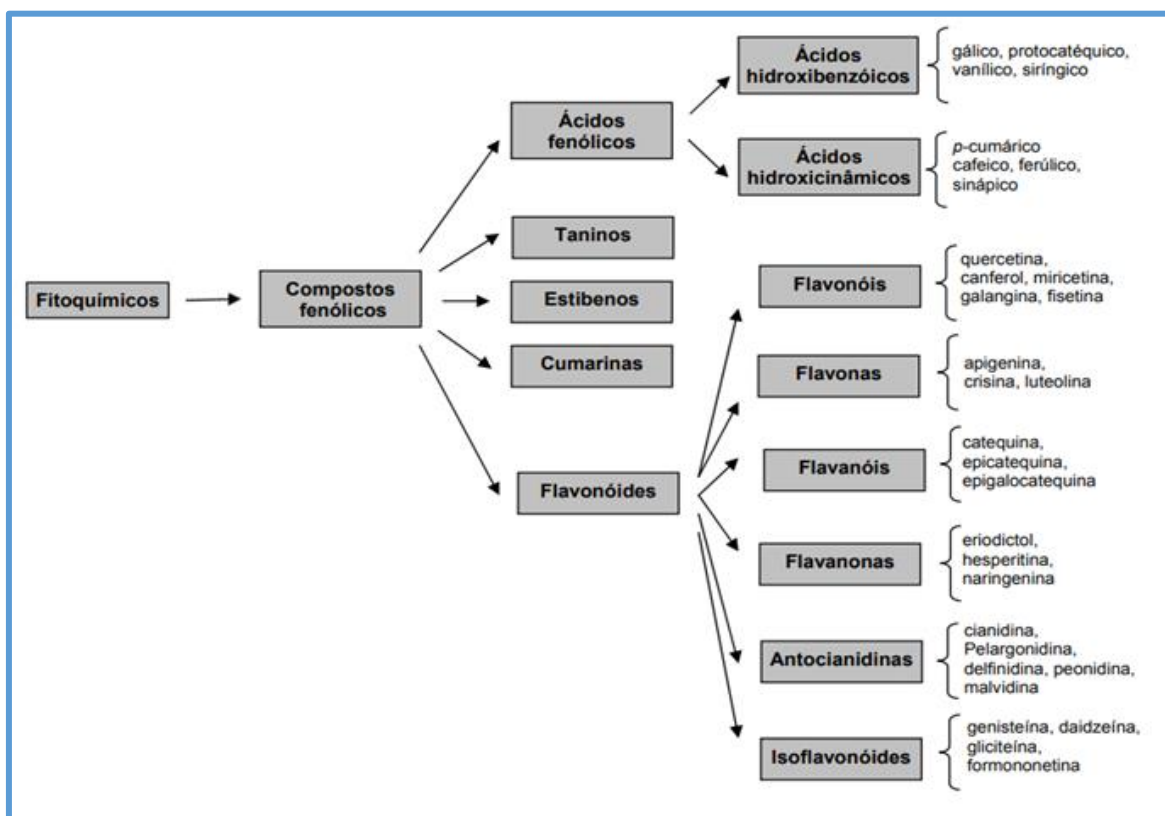


Figura 1.1 - Principais classificações dos compostos fenólicos, com exemplos para grupos mais estudados. Adaptado de [23].

1.3.1. Compostos flavonóides

Os flavonóides são os compostos com maior possibilidade de variação dentro do reino vegetal em questão de estrutura, porém sempre mantendo o esqueleto do difenil propano. Os compostos apresentam uma estrutura característica (Fig.1.2) formada por dois anéis aromáticos interligados por três átomos de carbono que pode formar uma estrutura heterocíclica oxigenada [31].

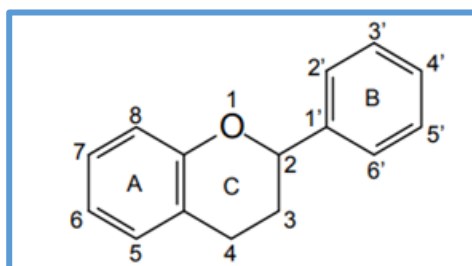
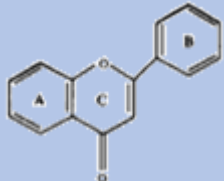
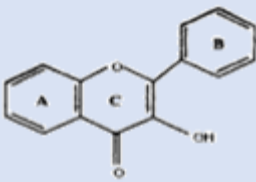
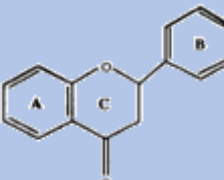
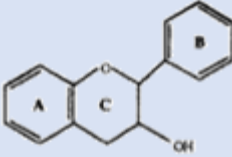
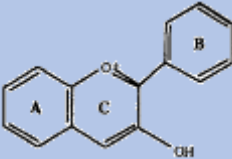
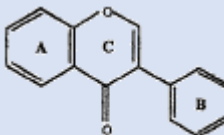


Figura 1.2 - Estrutura característica de um composto Flavonóide, com indicações dos anéis aromáticos A, B e C e respectivas numerações das posições dos carbonos da estrutura [31].

Os subgrupos dos flavonóides e suas respectivas estruturas químicas e alguns exemplos são apresentados na tabela 1.4. Alguns dos compostos apresentam o grupo hidroxila que influencia na degradação do mesmo, a qual pode variar conforme o grau de hidroxilação. A ausência do grupo hidroxila previne essa degradação, assim como também o grupo metila causa uma diminuição na degradação do composto [23], [29], [32].

A maioria dos flavonóides encontrados nos alimentos são glicosilados o que consequentemente influencia nas propriedades químicas, físicas e biológicas destes compostos. O açúcar que participa desta estrutura geralmente é a glucose e também pode variar em número e localização na estrutura do polifenol [32].

Tabela 1.4 - Diferentes subgrupos dos compostos fenólicos flavonóides e alguns exemplos para cada um dos grupos. Adaptado de [32].

ESTRUTURA PRINCIPAL	FLAVONÓIDES	ESTRUTURA QUÍMICA	EXEMPLOS
$C_6C_3C_6$	FLAVONAS		Apigenina,crisina, luteonina, nobiletina, tangeritina
	FLAVONÓIS		Quercetina, canferol, miricetina, galangina, fisetina
	FLAVANONAS		Eriodictol, hesperitina, naringenina
	FLAVANÓIS		Catequina, epicatequina, epigallocatequina, galocatequina
	ANTOCIANIDINAS		Cianidina, pelargonidina, delfinidina, peonidina, malvidina
	ISOFLAVONÓIDE		Genisteína, daidzeína, gliciteína, formononetina

1.3.2. Compostos não flavonóides

Dos compostos não flavonóides destacam-se os ácidos fenólicos que podem ser divididos em derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico (Fig.1.3). Os ácidos hidrocinâmicos são mais comum e amplamente distribuídos em plantas e grãos, e podem ocorrer nos tecidos destes compostos de forma conjugada e raramente como livre. Podem ser solúveis ou lipossolúveis e apresentam baixo peso molecular. Os compostos mais abundantes deste grupo são os ácidos ferúlico e o ácido cafeico. Os ácidos hidrobenzóicos são componentes com estrutura complexa como os taninos hidrolisáveis e não apresentam comum presença em alimentos ingeridos pelos humanos. Sendo assim, por consequência, são compostos pouco estudados e de baixo interesse nutricional. A principal fonte de ácido hidroxibenzoico é o chá, que apresenta na sua composição até 4,5 g/kg de ácido gálico [32][33].

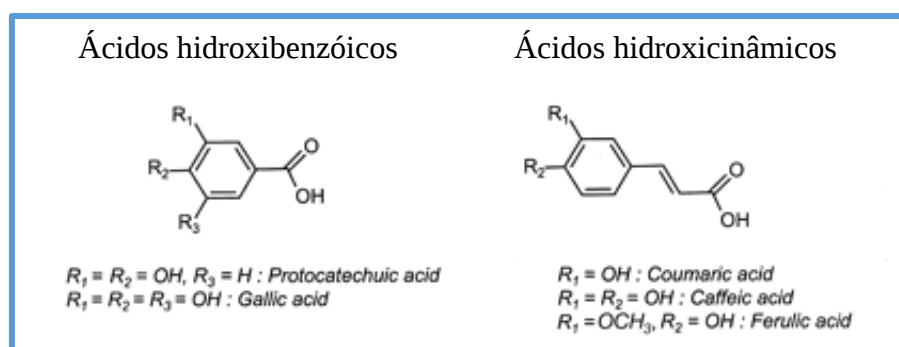


Figura 1.3 - Estruturas químicas dos ácidos fenólicos - ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos [33].

Os taninos, outra subdivisão dos compostos não flavonóides importante, são compostos com elevado peso molecular, com grandes estruturas e alta capacidade de associação com outros compostos biológicos essenciais como carboidratos e proteínas, e por consequência disso são compostos que apresentam características antinutrientes. Os taninos são divididos em dois grupos, os taninos hidrolisáveis, que são estruturas mais simples, formados geralmente a partir de unidades de ácido gálico esterificado e os taninos condensados, formados a partir de flavanóis (flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol) [29].

- Ácido gálico

Comumente conhecido como um antioxidante fenólico, o ácido gálico (AG), também conhecido como 3,4,5-triidroxibenzóico (Fig.1.4), faz parte do grupo dos ácidos hidrobenczóicos e representa a família dos metabolitos secundários vegetais. Além de ser antioxidante, este composto apresenta outras características como antifúngicas, antimicrobiana e anticancerígenas. O AG pode ser obtido através de uma hidrólise ácida dos taninos hidrolisáveis, uma vez que é o principal componente destes compostos.

Este composto pode ser encontrado em frutas, vegetais e derivados (bebidas), estando presente em todas as partes da planta como casca, madeira, folha, fruto, raiz e semente [34]–[37].

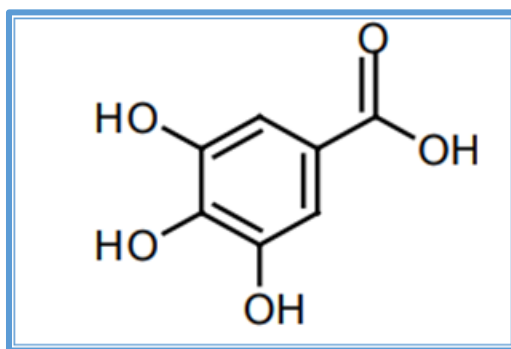


Figura 1.4 - Estrutura química do ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico)[34].

- Ácido tânico

Representa um tanino ($C_{76}H_{52}O_{46}$) específico, que contém na sua estrutura 10 unidades de 3,4,5-trihidroxifenil em torno de uma glucose (Fig.1.5). Apesar deste composto não apresentar grupos carboxílicos, é considerado um ácido fraco por consequência da presença das hidroxilas fenólicas. Desta forma, este composto é totalmente solúvel em água. O ácido tânico (AT) pode ser encontrado em diversas frutas e alimentos, com destaque para os vinhos e chá preto. Nos vinhos este composto é responsável pelo amargor e adstringência da bebida e realiza a clarificação e estabilização da cor do produto [38]–[41].

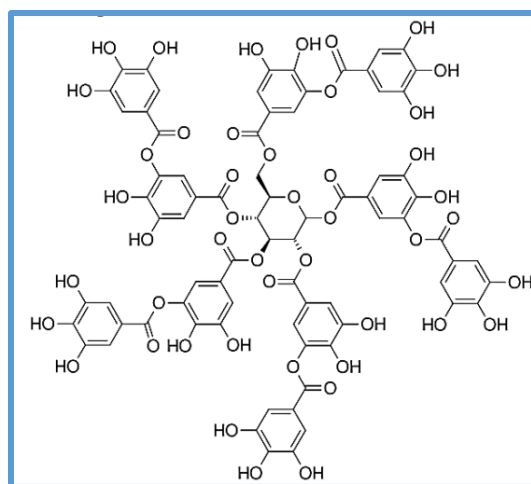


Figura 1.5 - Estrutura química do ácido tânico [40].

1.4. Metodologias de análise de compostos fenólicos

Existem diferentes metodologias de quantificação de compostos fenólicos em alimentos e bebidas, uma vez que esses compostos apresentam uma vasta diversidade em número, tipo e concentração. Os ensaios utilizados para essa determinação podem ser classificados como os que quantificam um grupo ou classe específica de um composto fenólico ou os que determinam o teor total presente na amostra. A quantificação é influenciada pelas variantes básicas presentes em praticamente todos os ensaios de quantificação como tamanho da amostra, condições de armazenamento, seleção de padrões, presença de interferentes e tempo de ensaio. No caso da análise dos polifenóis há também influência da natureza química do composto, o método de extração empregado (se necessário), e o método de ensaio [42-43].

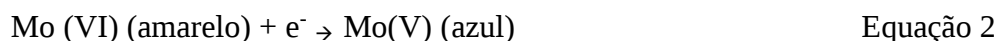
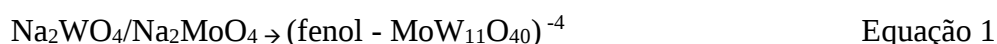
1.4.1. Métodos espectrofotométricos

Existem vários métodos espectrofotométricos para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. Os métodos espectrofotométricos estudam de modo geral a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria, sendo assim, estes ensaios são elaborados com base em diferentes princípios para determinar os grupos estruturais dos compostos fenólicos. Os métodos espectrofotométricos resultam numa estimativa bruta, sendo muito empregado em estimativas aproximadas de compostos fenólicos em vinhos e sumos [42-43]. Dentro dos métodos espectrofotométricos existem diferentes

metodologias, as quais podem ser divididas por métodos para a determinação dos compostos fenólicos totais, os mais utilizados, que englobam o método Folin-Ciocalteu, ou metodologias mais específicas, como por exemplo, para a determinação de taninos condensados e compostos fenólicos relacionados, o método de Vanilina. Outros exemplos são empregues para a determinação de taninos condensados insolúveis, de taninos hidrolisáveis, antocianidinas e dos ácidos clorogênicos.

- Métodos Folin-Ciocalteu

Este método serve para a determinação de compostos fenólicos totais em material de origem vegetal. Funciona a partir da avaliação da quantidade de substância necessária para inibir a oxidação do reativo. É utilizado um reagente específico, formado por uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que após a oxidação dos polifenóis é reduzido a uma mistura de azuis de tungstênio (W_8O_{23}) e molibdénio (Mo_8O_{23}), a reação colorimétrica (Fig.1.6) é evidenciada pelas equações 1 e 2. A coloração azul produzida neste ensaio apresenta um máximo de absorção num comprimento de onda de 750 nm e é considerada proporcional a quantidade total de compostos fenólicos originalmente presentes na amostra. Uma desvantagem deste método é que ele não é específico, logo mede a capacidade redutora total, uma vez que o reagente Folin-Ciocalteu (FC) reage com todas as substâncias passíveis de serem reduzidas. Assim o ensaio sofre interferência de outras substâncias, como por exemplo o ácido ascórbico [29], [42], [44].



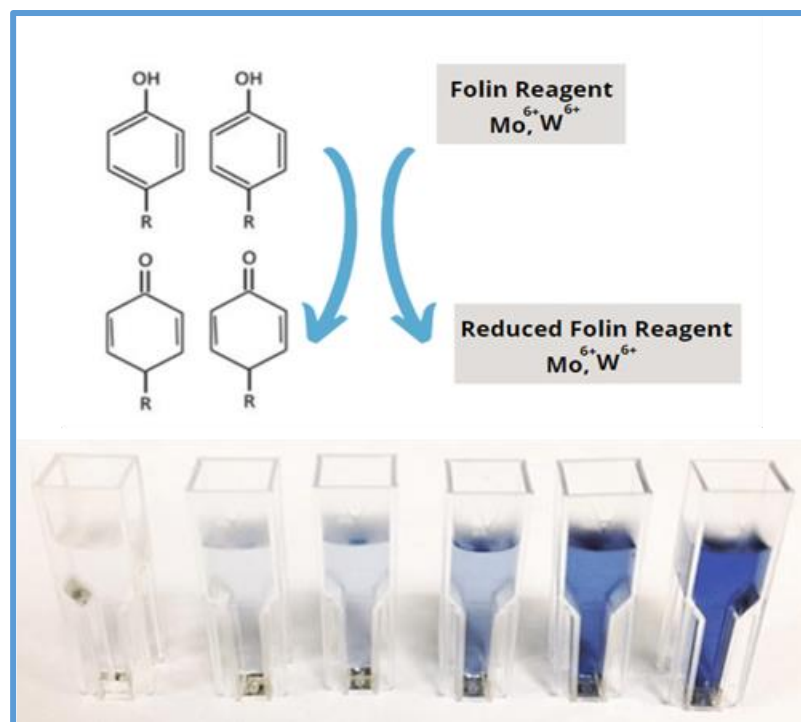


Figura 1.6 - Reação do método Folin-Ciocalteu e respectivas colorações formadas com a variações de intensidade conforme presença de polifenóis. Adaptado de [45].

- Método Vanilina

Consiste num método de carácter específico para compostos flavanóis (catequina), dihidrochalconas e proantocianidinas, que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos meta-hidroxil livre no anel aromático B (Fig.1.2). Além de específico, esse método é considerado simples e sensível. Neste método, ocorre a condensação do reagente vanilina em meio ácido, geralmente ácido clorídrico. Na reação com o composto fenólico, no anel aromático na posição 6 ou 8, formando um condensado, o produto intermediário dessa reação é um composto cor de cereja/vermelho cuja intensidade permite estimar o teor de compostos fenólicos na amostra em um comprimento de onda de 500 nm. A vantagem deste método é a possibilidade de determinação de taninos condensados, porém apresenta custo elevado. Algumas interferências foram relatadas nesse método, principalmente na determinação de taninos pelas antocianinas, uma vez que apresentam pico de absorção idênticos. Além disso, o ácido ascórbico e clorofilas também podem gerar interferências. Em ambos os casos a solução para eliminar as interferências é a extração/remoção destes compostos[42], [43], [45].

Este método é afetado pela natureza ácida e concentração do substrato, tempo de reação, teor de água, temperatura e concentração do reagente vanilina. Alguns estudos comprovam que obtiveram melhor rendimento e sensibilidade do ensaio quando utilizaram o reagente em meio ácido substituindo o ácido clorídrico por ácido sulfúrico [42].

1.4.2. Métodos Cromatográficos

Diferentes tipos de técnicas cromatográficas são utilizados para a quantificação, separação, isolamento e purificação de compostos fenólicos. A cromatografia permite separar componentes de misturas complexas. A amostra é sempre transportada numa fase móvel (gás, líquido ou fluído supercrítico), e é forçada a percorrer em uma fase estacionária imiscível e fixa, geralmente em uma coluna. Nos primórdios da aplicação desta técnica foi utilizado a cromatografia gasosa (GC), técnica bastante complicada para compostos fenólicos uma vez que estes compostos apresentam baixa volatilidade, havendo necessidade de fases intermediárias.[42], [43], [46].

Outra técnica cromatográfica atualmente bastante aplicada e considerada como padrão para análise de compostos fenólicos é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) que apresenta vantagens como a aplicação direta de amostras, excluindo a necessidade de um pré-tratamento e um tempo de análise menor comparado com outros métodos. Alguns estudos de determinação de compostos fenólicos por HPLC são apresentados na tabela 1.5, bem como as características da técnica empregada, o tipo de coluna utilizada, o método de eluição e o detetor empregado[29], [42], [33].

As técnicas HPLC são amplamente utilizadas para separação e quantificação de compostos fenólicos, uma vez que há suportes e fases móveis disponíveis capazes de detetar e analisar alicinas, procianidinas, favonóis, flavanóis, flavonas e ácidos fenólicos. Alguns estudos comprovam que a utilização de colunas em fase reversa melhorou significativamente a separação por HPLC em análises realizadas com diferentes compostos fenólicos [42], [43], [47].

Apesar da técnica HPLC apresentar vantagens, ainda assim é uma técnica bastante cara que exige grandes quantidades de solventes orgânicos, o que configura uma técnica não sustentável. Embora seja uma técnica considerada fácil, são necessários

conhecimentos complexos pois há grande variabilidade de módulos, colunas e fases móveis conforme a necessidade de análise.

Tabela 1.5 - Exemplos de procedimentos de HPLC para determinação de polifenóis em diferentes amostras.

Amostra	Preparação amostra	Fase estacionária	Fase móvel
Vinho [48]	Desalcoolizado sob vácuo; fracionamento de procianidinas e catequinas usando dois cartuchos C ₁₈ Sep Pak em série	Superesfera 100 RP18 (250 x 4 mm; 4 µm)	A: H ₂ O ; B: H ₂ O - ácido acético (90:10, v/v); catequinas : 10–80 % B, 0–5 min; 80–100 % B, 5–29 min; 100 % B, 29–45 min; prociaidinas: 10–70 % B, 0–40 min; 70–85 % B, 40–55 min; 85–100 % B, 55–74 min
Vinho tinto [49]	Injeção direta	Ultraesfera (C18) ODS (250 mm × 4,6 mm; 5 µm)	A: H ₂ O - ácido fórmico (9:1, v/v); B: CH ₃ CN –H ₂ O - ácido fórmico (3:6:1, v/v/v); gradiente: 20–85 %; B, 0–70 min - 85–100 % B, 70–75 min - 100 %; B, 75–85 min
Vinho tinto e Sumos de frutas [50]	Desalcoolização do vinho em vácuo; diluição do sumo em água; Separação das azeitocinas usando C18 Sep-Pak	SPLC-18-DB (250 x 10 mm 5 µm) preparado em fase reversa com pré-injeção de C18 saturado com sílica (75 x 4,5 mm, 12 µm) e proteção de Cupelco LC-18 fase reversa empacotada (50 x 4,6 mm, 20-40 µm). Superesfera (C18) ODS (250 x 4,6 mm)	A: 5% ácido fórmico em H ₂ O; B: ácido fórmico-H ₂ O-MeOH (5:5:90,v/v/v); Gradiente linear:5-20 % B em A,0-1 min;20-25 % B em A,1-12 min;25-32 % B em A, 12-32 min; 55-100 % B em A, 38-44 min: 100 % B, 44-46 min; 100-5 % B em A, 46-47 min.

1.4.3. Método tiras colorimétricas

Conforme as necessidades de métodos rápidos, baratos, seletivos e simples surgem novas alternativas para a determinação de polifenóis em alimentos/bebidas. Os sistemas analíticos baseados em papel são uma ótima alternativa para essas necessidades de verificação rápida através de correlações colorimétricas quantitativas possíveis através da medição da intensidade da cor gerada. Esse tipo de metodologia é bastante aplicado em avaliações de polifenóis em bebidas. Das aplicações encontradas há um sensor para análise de café, que combina a periodato de sódio, substituto da enzima tirosinase que funciona como agente oxidante de compostos fenólicos. O produto da oxidação reage

com hidrazona de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) formando um composto colorimétrico que pode ser quantificado espectrofotometricamente. Sendo assim, o trabalho consiste na elaboração de um biossensor numa base de papel, um teste de tira simples, para determinação de polifenóis totais, que resultou sensibilidade ao ácido clorogénico formando um composto cor de rosa que é analisado e medido pelo *software ImageJ* [50]. Outro estudo que relata o desenvolvimento de um teste em tira colorimétrica baseado em papel para a determinação de compostos fenólicos, utilizando a mesma metodologia apresentada, onde a enzima tirosinase é imobilizada na superfície de um filtro de papel simples com MBTH, permitindo assim a deteção de compostos fenólicos, através da formação de compostos colorimétricos que variam a intensidade da cor proporcionalmente à concentração de analito, ou seja, quanto maior a concentração de compostos fenólicos, maior a intensidade da cor encontrada no ensaio [51].

Considerando o ensaio FC o método colorimétrico mais aplicado para análise de composto fenólicos totais, como vinho e chá, surgem novos estudos a tentar trazer simplicidade e sensibilidade ao método. A combinação do ensaio FC com a tecnologia microfluídica (sistemas que permitem uma pequena quantidade de líquido através de microdispositivos) à base de papel, mais comumente conhecida como dispositivos micro analíticos à base de papel (μ PADs) que combina vantagens na simplicidade de obtenção de resultado. Esta tecnologia combina o conjunto de reações FC realizadas em um mesmo sensor de papel através de uma distribuição simultânea em papel. Este estudo realizou uma medição válida para teores de ácido gálico [52].

Outra metodologia colorimétrica aplicada em papel é uma plataforma que analisa simultaneamente a capacidade antioxidante e conteúdo fenólico total. Para isso é necessária a aplicação de ensaios específicos para avaliação de atividade antioxidante, neste caso o 2,2'-azino-di(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico (ABTS) e ensaio de capacidade antioxidante redutora cúprica (CUPRAC) e ensaios de análise FC (Fig.1.7). O dispositivo apresenta uma zona central para colocação da amostra que está conectada a quatro zonas de pré-tratamento seguidas por zonas de deteção que contém os reagentes armazenados referentes a cada ensaio. Os resultados colorimétricos obtidos através deste dispositivo foram analisados com auxílio de *software ImageJ* e as intensidades das cores foram proporcionais a concentração da atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos [53-54].

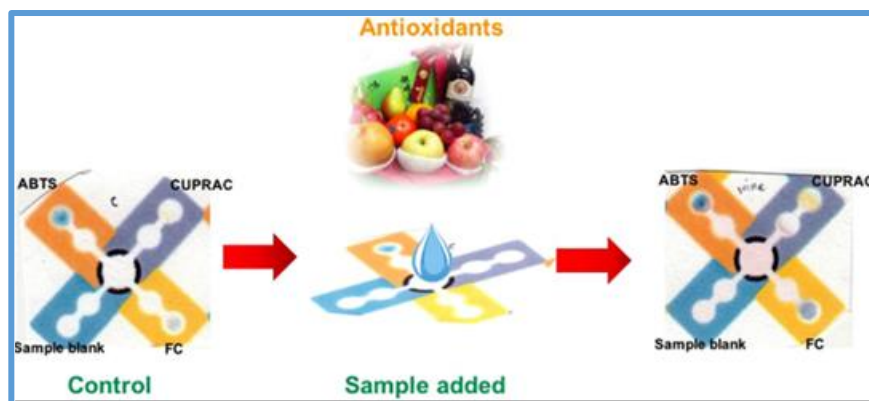


Figura 1.7 - Dispositivo para avaliação simultânea de atividade antioxidante e conteúdo fenólico total em tiras de papel colorimétrica conforme descrito em [54].

1.6 Enzimas

As enzimas são classificadas como proteínas, e são compostas por longas cadeias de aminoácidos de elevado peso molecular. As enzimas apresentam uma complexa estrutura tridimensional de uma ou mais cadeias polipeptídicas, não excluindo a possibilidade de serem também constituídas por componentes não-peptídicos. As enzimas atuam como catalisadores, ou seja, aceleram as reações químicas promovendo o alcance do equilíbrio através da diminuição da energia de ativação. Além da habilidade catalítica as enzimas também apresentam alta especificidade. As enzimas possuem diferentes tipos de classificação, sendo mais comum uma classificação em grupos conforme o tipo de reação que é catalisada, variando em seis diferentes grupos: óxido-redutase; transferases; hidrólases; liases: isomerases e ligases. As mais comuns são as óxido-redutases, que catalisam reações redox, onde envolve uma etapa de transferência de elétrons no ciclo da enzima. As enzimas redox necessitam a presença de um composto, o co-fator, para ocorrer a atividade catalítica, que pode ser uma molécula orgânica (co-enzima) ou um ião metálico. Os tipos de enzima que apresentam destaque dentro deste grupo são as oxidases, desidrogenases e as peroxidases [55],[56].

- Peroxidases

As enzimas classificadas como peroxidases são as mais utilizadas e apresentam uma larga escala de produção por consequência do seu alto uso comercial. Este tipo de enzima é caracterizado pela presença do grupo prostético heme no centro ativo, que é oxidado na presença de H_2O_2 , ocasionando assim a formação de radicais II , que podem oxidar outros substratos (orgânicos e inorgânicos). A peroxidase *horseradish peroxidase*,

HRP, é uma glicoproteína globular obtida a partir de uma planta conhecida como raiz forte, bastante característica em regiões de climas temperados. Esta planta é rica em isoenzimas, sendo a tipo C a mais abundante. A HRP apresenta na sua composição Fe(III) e protoporfirina IX (heme) conforme apresentado na figura 1.8. A utilização de HRP tem sido empregada em química bioanalítica e clínica uma vez que este tipo de enzima apresenta propriedades relativamente estáveis, baixo custo, atividade catalítica eficaz e alta variedade de substratos comparado com outras enzimas oxi-redutoras.

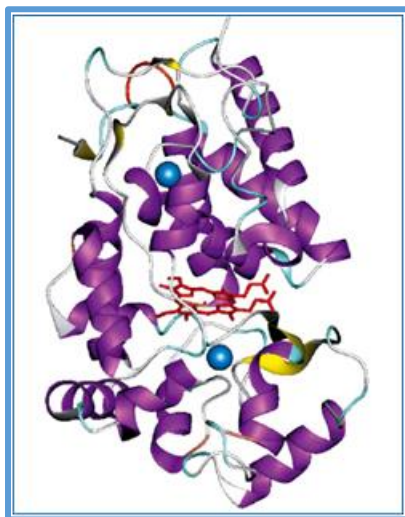


Figura 1.8 – Representação tridimensional da estrutura da HRP, neste caso o grupo heme é representado pela estrutura vermelha entre moléculas de cálcio (esferas azuis) [57].

A presença do íon de cálcio na estrutura da HRP garante a sua estabilidade e realiza um certo controlo na atividade desta enzima. Entre este íon fica localizado o grupo heme em um ambiente hidrofóbico. A HRP apresenta um ponto isoelétrico (PI) de 7,2 e um pH ótimo entre 5,0 e 6,5. A atividade enzimática é afetada pela temperatura, tornando-se mais sensível para temperaturas acima de 50°C. As HRPs são amplamente utilizadas na composição de sensores enzimáticos por consequência da sua capacidade redox elevada, sendo assim a fundamentação para uso deste tipo de enzima envolve o mecanismo de catálise representado na figura 1.9. Neste mecanismo um dos oxigénios presentes na molécula de H_2O_2 é eliminado em forma de água, enquanto o outro fica retido no grupo heme, onde há presença do Fe^{3+} que sofre oxidação causada pelo H_2O_2 formando o composto I. Em consequência da falta de doadores fortes de eletrões o composto I sofre uma redução formando o composto II, que aceita um eletrão de outra molécula de substrato podendo retornar a forma nativa da enzima. A redução do composto

II é geralmente considerada a etapa determinante da velocidade da reação. É preciso ter atenção que o excesso de H_2O_2 pode inibir o ciclo catalítico, causando a inativação da enzima de forma irreversível, causando a perda da atividade total [60], [57],[58].

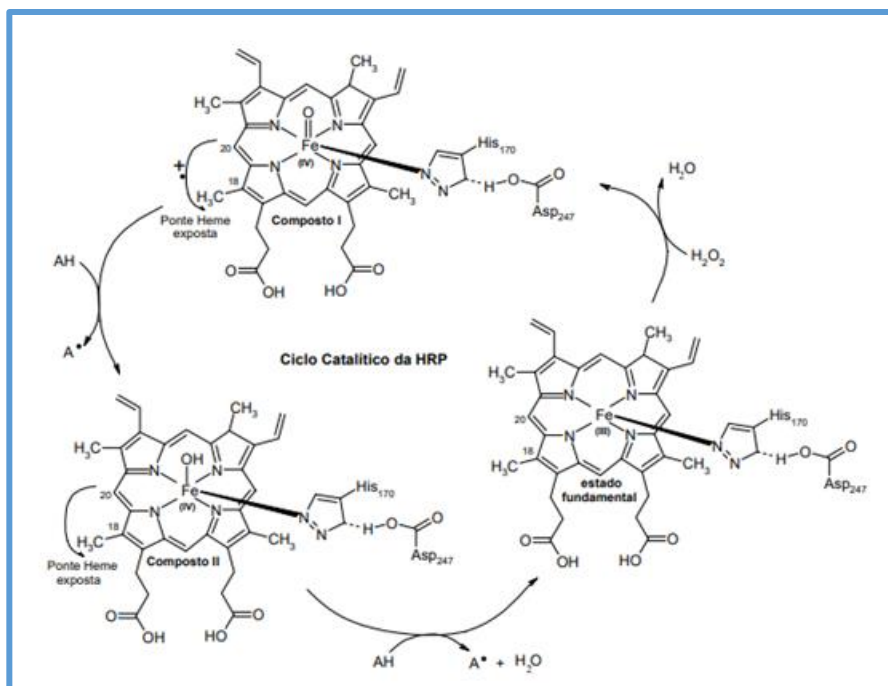


Figura 1.9 - Mecanismo do ciclo catalítico da HRP na presença do agente oxidante (H_2O_2), onde AH é o substrato redutor e o A^* o radical livre formado [55].

Para o desenvolvimento de técnicas direcionadas para leituras de sinais colorimétricos é comum a utilização de enzimas, neste caso HRP, com diversos tipos de substratos cromogênicos, sendo o TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) um dos mais utilizados. Normalmente o TMB é incolor, mas oxidado durante a degradação enzimática do H_2O_2 é responsável pela formação de uma coloração azul intensa e/ou amarela. No esquema de oxidação do TMB existem dois produtos quimicamente distintos (Fig.1.10), que consistem em um radical positivo de TMB e o outro em um complexo de transferência de carga constituído por um doador de elétrons na forma de diimina, que está em equilíbrio químico com o radical catiónico. Conforme o esquema apresentado, as estruturas formadas apresentam propriedades próprias de absorvância molar máxima, sendo a do TMB nativo 285 nm, seguido pelo complexo de transferência de carga com uma absorvância máxima de 652 nm (coloração azul) e a última, a forma diimina que através da perda de dois elétrons apresenta uma absorvância máxima de 450 nm [59]

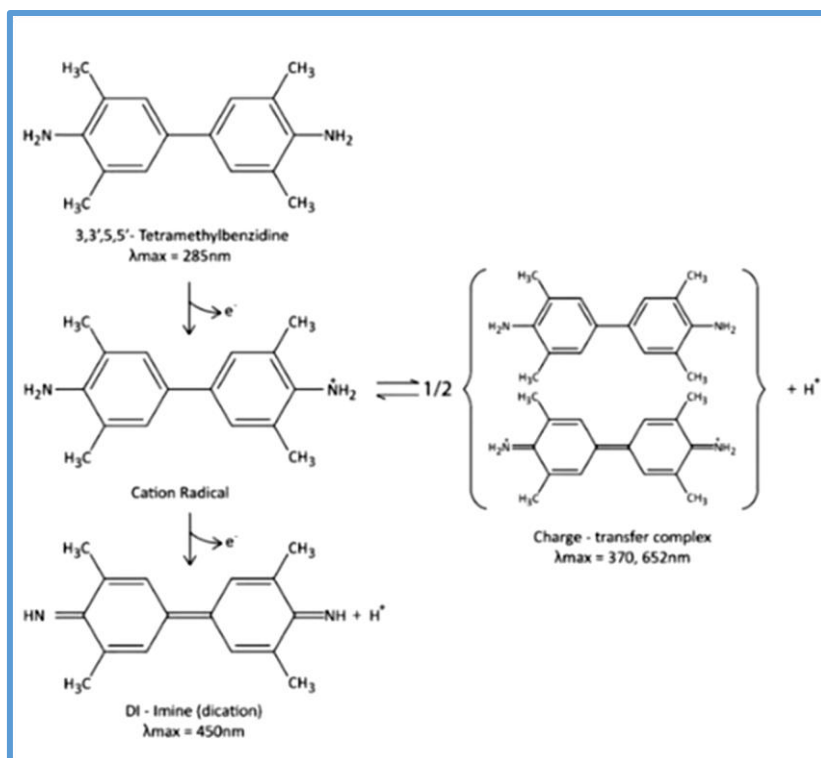


Figura 1.10 – Produtos intermediários da oxidação o TMB formados após a oxidação da HRP, podendo ser formada uma coloração azul (652 nm) ou amarelada (450 nm) [59].

O funcionamento da enzima no substrato varia conforme a composição do mesmo, pois pode afetar a reação de maneira positiva ou negativa. Como citado anteriormente, os compostos fenólicos apresentam altas capacidades antioxidantes, sendo assim em metodologias colorimétricas que envolvam reações redox com HRP/TMB/H₂O₂ a presença destes compostos em solução podem causar um efeito inibidor na formação da cor esperada, impedindo então a oxidação do TMB pela enzima/nanoenzima. A figura 1.11 mostra este funcionamento, onde o TMB inicialmente incolor, na presença do H₂O₂ e HRP sofre oxidação, porém com a presença do composto fenólico a cor é amenizada, esse mecanismo permite assim a quantificação de teores de polifenóis relacionando a absorvância formada conforme a concentração de composto fenólico presente [60].

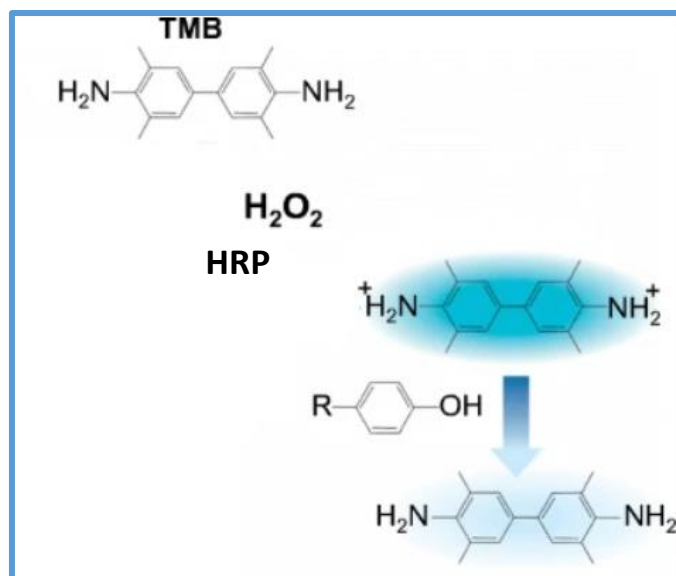


Figura 1.11 - Esquema da reação de oxidação do TMB pela peroxidase na presença do peróxido de hidrogênio formando uma coloração azul forte, que com a presença de compostos fenólicos sofre inibição permitindo a detecção dos mesmos. Adaptado de [60].

- Enzima artificial - NcAP

As enzimas por serem macromoléculas biológicas acabam por não fornecer uma estabilidade completa a longo prazo para a formulação de metodologias desenvolvidas que dependem do uso de HRPs, por exemplo. As enzimas apresentam uma instabilidade inerente, causada principalmente pelo processo de desnaturação. Uma solução valiosa para esse problema é a utilização de enzimas sintéticas que mimetizem a atividade da peroxidase. Está tecnologia já é uma realidade bastante aplicada, conhecida como nanoenzimas, que consistem em nanomateriais com atividades enzimáticas de elevado desempenho. Este tipo de material apresenta maior estabilidade estrutural em comparação com as enzimas naturais [60-61].

As nanoenzimas tem como definição a presença de atividade catalítica e um dos primeiros materiais testados com essa característica foi o óxido de ferro em meados de 2007, e desde então a investigação referente a este tipo de material apresentou avanços significativos, apresentando resultados como baixo custo, produção facilitada em larga escala e alta estabilidade e durabilidade. Um dos materiais comumente utilizados que apresenta destaque é o azul de prússia (AP), que tem capacidade de mimetizar várias enzimas, principalmente as peroxidases.

O AP apresenta uma estrutura metal-orgânica composta por ferros, férricos e ferrosos alternados e coordenados por cianetos. A obtenção deste nanomaterial pode ser realizada de diversas maneiras, apresentando assim uma alta variação em termos de custo e processo sustentável. Este composto apresenta atividade semelhante a HRP em meios ácidos devido a grande presença de ferro férrico e ferroso disponível, uma vez que estes compostos oxidam vários substratos como o TMB e o ABTS. O TMB quando oxidado na presença do peróxido de hidrogénio apresenta pico de absorção a 652 nm (cor azul), sendo a intensidade do pico proporcional ao substrato e a concentração de enzima. A utilização do AP apresenta comportamento igual/semelhante a HRP nestas condições de oxidação (Fig.1.12) [60-61].

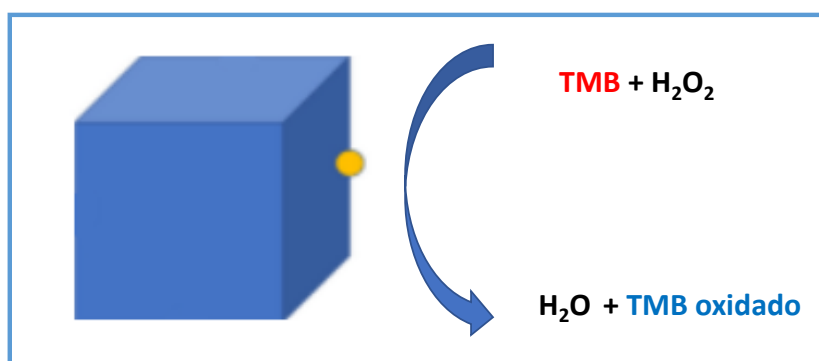


Figura 1.12 - Reação da nanoenzima tipo AP mimetizando HRP. Adaptado de [61].

2.DESCRICÃO EXPERIMENTAL

De forma geral, o trabalho desenvolvido inicia-se pelo desenvolvimento de um método colorimétrico enzimático, para avaliação de teores de compostos fenólicos em bebidas comerciais. Para tal, foi avaliada a atividade catalítica da enzima HRP e de um nanomaterial capaz de mimetizar a atividade catalítica desta enzima, NcAP.

Ao longo deste capítulo são referidas as metodologias desenvolvidas e todos os materiais, reagentes e equipamentos envolvidos.

2.1. Equipamento e materiais

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos, com capacidades de 10,00 a 1000,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos foram utilizadas pipetas automáticas da marca Gilson, modelos P10 a P5000, de volume regulável. As leituras de absorvância foram realizadas num espectrofotômetro UV-Vis da marca Thermo Scientific, modelo Evolution 220 (Fig.2.13), em cuvetes plásticas descartáveis de 1 cm de percurso ótico com capacidade máxima de 2,5 mL. O pH foi ajustado e controlado por um potenciômetro da marca Crison, modelo pH Meter GLP 22, com um eletrodo de vidro combinado. Para facilitar a dissolução de algumas soluções foi utilizado banho de ultrassons da marca Fungilab, com regulação de temperatura e tempo.



Figura 2.13 - Espectrofotômetro UV-Vis da marca Thermo Scientific, modelo Evolution 220.

A análise morfológica do nanomaterial de grafeno modificado com NcAP foi realizada usando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de Alta Resolução (Schottky) com Microanálise de Raios-X e Análise de Difração Retrodifusa de Eletrônicos: Quanta 400 FEG ESEM/EDAX Genesis X4M.

2.2. Reagentes e soluções

A água utilizada para preparação das soluções aquosas em geral foi ultra-pura com uma condutividade igual ou inferior a $0.054 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C . Os reagentes utilizados neste trabalho não passaram por processos de purificação adicional, sendo eles: Pastilha para tampão salina de fosfato (PBS) (Fisher BioReagents), ácido tânico (Riedel-de-Haen), ácido gálico ($\geq 99\%$, Panreac), peróxido de hidrogénio (35 %, Labchem), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) ($\geq 99\%$, TCI), horseradish peroxidase (HRP) (Sigma), dimetilsulfóxido (DMSO) ($\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich), ácido fosfórico (85 %, Riedel-de-Haen), cloreto de potássio (Merck), hexacianoferrato de potássio III ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (Fluka), grafite (99 %), polietilenoimina (PEI) (Aldrich).

- Amostras

Foram avaliados seis diferentes tipos de bebidas comerciais de diferentes marcas (Fig. 2.14). Todas as bebidas analisadas foram adquiridas no comércio nacional e foram as seguintes: (i) Água aromatizada Vitalis limão magnésio; (ii) Sumo Compal 100% fruta sabor maçã; (iii) Vinho Contemporal tinto 2020; (iv) Vinho Contemporal branco 2020; (v) Cerveja SuperBock mini; (vi) Chá verde marca Froiz e marca Tetley.

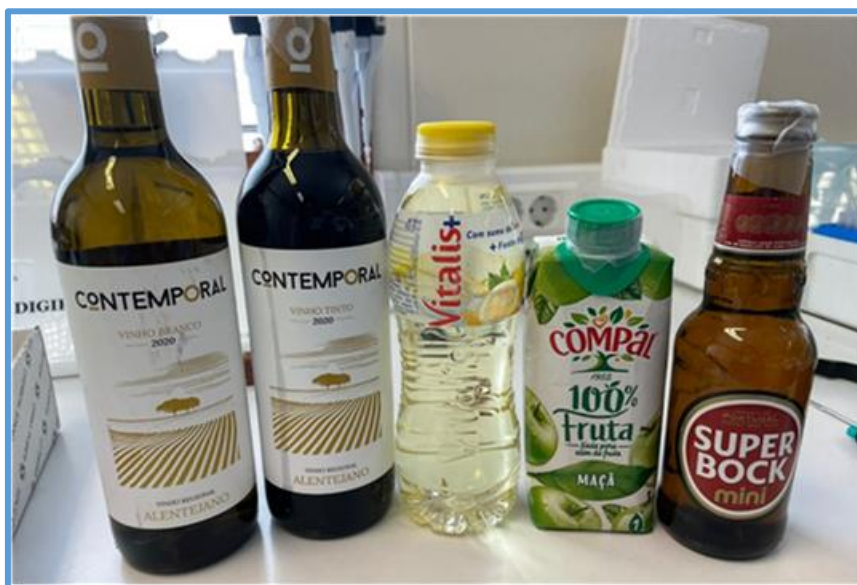


Figura 2.14 - Bebidas comerciais utilizadas para avaliação dos compostos fenólicos.

2.3. Procedimentos experimentais

2.3.1 Síntese NcAP

Os nanocubos de azul de prússia (NcAP) foram sintetizados de acordo com um método descrito anteriormente na literatura com algumas modificações [62]. O composto sintetizado consiste num nanomaterial compósito à base de óxido de grafeno modificado com os NcAP, sintetizado através de uma técnica de refluxo. Esta técnica foi utilizada com o objetivo de manter o material sob aquecimento durante várias horas, evitando assim perdas de materiais (solvente, reagentes e/ou produtos) por evaporação. Neste procedimento é necessária a utilização de (bio)grafeno (Figura 2.15A). Este nanomaterial foi produzido no BioMarkISEP de acordo com a referência [63]. Em resumo, cristais de grafite (100 mg/mL) são adicionados em 200 mL de solução de proteína bovina sérica albumina (3 mg/mL) diluída em água a pH 7. Esta mistura é submetida a uma agitação e cisalhamento num liquidificador doméstico durante 30 minutos e posteriormente centrifugada de forma a obtermos folhas de (bio)grafeno. Nesta etapa é fundamental o acompanhamento da temperatura do sistema, para evitar sobreaquecimentos. A partir deste nanomaterial, foi então desenvolvido o compósito de (bio)grafeno modificado com NcAP conforme o procedimento descrito em [62], onde 10 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (pH 1.1; 5 mM), 1 mL de PEI (3%) e 10 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (pH 1.1; 5 mM) são adicionados em 10 mL de (bio)grafeno (6,7 mg/mL, pH 1.1) com agitação e aquecimento durante 3 horas. A cor da mistura inicialmente castanha-amarelada, passa a azul-escuro conforme ocorre a reação, sugerindo a formação dos NcAP em torno do grafeno (figura 2.15B). No final é recomendado que o material passe por lavagens e seja (re)disperso em 10 mL de água.

A figura 2.15 representa a análise morfológica através do equipamento MEV do biografeno (A) e do óxido de grafeno modificado com as nanopartículas de NcAP (B).

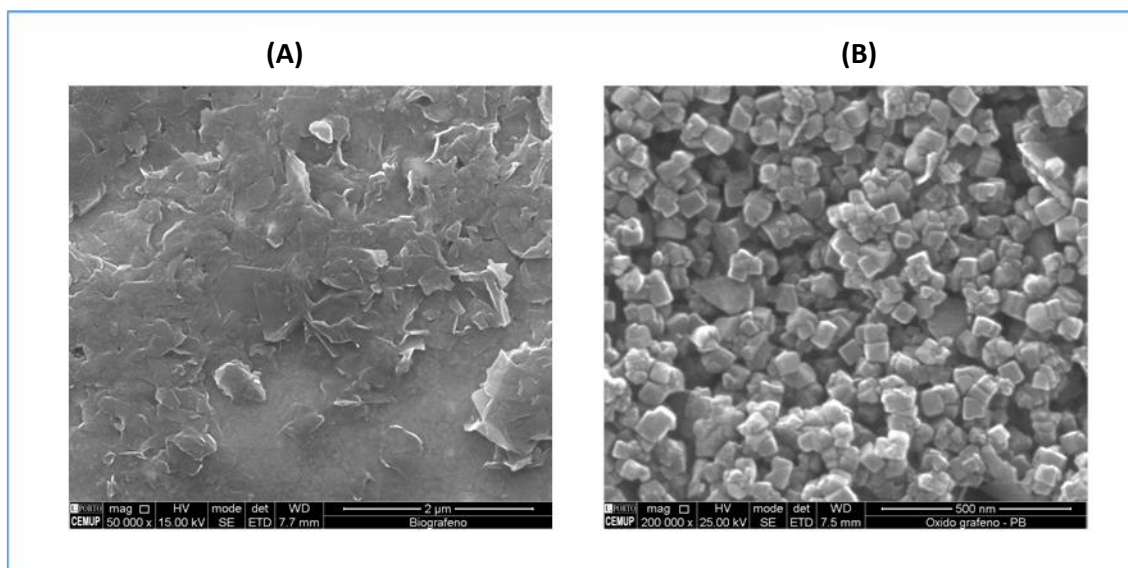


Figura 2.15 - Imagens MEV (A) biograpeno e (B) óxido de grafeno modificado com NcAP.

2.3.2. Metodologia para determinação colorimétrica de compostos fenólicos – HRP

A determinação colorimétrica de compostos fenólicos foi realizada em cuvetes de plástico descartáveis de 2,5 mL contendo HRP (0,03 $\mu\text{g/mL}$), H_2O_2 (4,0 mM), TMB (400 μM), PBS e diferentes quantidades de compostos fenólicos alvo (ácido gálico e ácido tânico). Numa primeira fase, foi realizado um estudo para a determinação das concentrações ótimas dos componentes da reação, as proporções adotadas como iniciais foram seguidas conforme descrito no estudo [64], porém foram necessárias algumas alterações conforme as necessidades do sistema até se chegar a conclusão das concentrações ótimas. Também foram otimizadas condições de tempo de reação e pH. Para esse estudo, 10-200 μM de solução de AG foi preparada a partir de uma solução stock de 4000 μM , e 0,5-10 μM de AT a partir de uma solução stock de 200 μM . A mistura foi incubada por 2 minutos a temperatura ambiente, e a absorvância foi monitorizada no espectro UV-Visível (652 nm). Os valores de limite de detecção (LOD) para ambos os compostos foram calculados pelo desvio padrão do branco sobre a inclinação da curva de calibração. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Através deste método foram analisadas diferentes amostras de bebidas comerciais para determinação da concentração de compostos fenólicos em relação ao AG e AT.

2.3.3. Atividade mimética da peroxidase dos NcAP

A atividade do tipo peroxidase dos nanomateriais sintetizados foi investigada num ensaio a temperatura ambiente usando TMB como substrato na presença de H_2O_2 . O ensaio foi realizado com 4 diferentes sistemas de reação formados por diferentes componentes, sendo eles (i) PBS + TMB + H_2O_2 + NcAP; (ii) PBS + TMB; (iii) H_2O_2 + TMB; (iv) TMB. Através dos resultados destes ensaios é possível verificar a importância dos constituintes para a reação de oxidação e se o material sintetizado tem capacidade de catalisar a reação conforme ocorre com a HRP, formando um composto azul sem influência dos outros componentes da reação [65].

2.3.4. Metodologia para determinação colorimétrica de compostos fenólicos utilizando enzima artificial NcAP

A determinação de compostos fenólicos com a utilização de enzima artificial seguiu os mesmos padrões conforme descrito no item 2.3.2, porém com algumas alterações. O ensaio também foi realizado em cuvetes de 2,5 mL contendo NcAP (0,01 $\mu\text{g/mL}$), H_2O_2 (4,0 mM), TMB (400 μM), com diferentes concentrações de AG e AT. Também foi analisado o tempo de reação da mistura, sendo determinado um tempo de incubação ideal igual a 2 minutos a temperatura ambiente. A gama de concentração para o AG foi de 10-200 μM , partindo de uma solução stock de 4000 μM . Para o AT as concentrações de foram de 1.0-20,0 μM , preparadas a partir de uma solução stock de 400 μM . As absorvâncias das soluções foram monitorizadas no espectro UV-Visível (652 nm) e os valores de LOD para ambos os compostos foram calculados pelo desvio padrão do branco sobre a inclinação da curva de calibração. O método desenvolvido foi utilizado para determinação da concentração de compostos fenólicos em teores de AG e AT presentes nas bebidas comerciais utilizadas como amostra conforme descrito no item 2.2.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho, tendo como finalidade responder ao objetivo proposto de desenvolver uma metodologia colorimétrica para a determinação de compostos fenólicos em bebidas comerciais utilizando uma enzima natural, e avaliar a possibilidade de mimetização desta técnica através de uma enzima artificial. O nanomaterial utilizado como enzima artificial, NcAP já se encontrava testado e validado pelo grupo BioMark ISEP em termos de desenvolvimento e síntese para diferentes aplicações. A utilização deste material para mimetizar a atividade enzimática de uma peroxidase consiste num estudo inédito.

3.1. Otimização das condições da reação com HRP

Num primeiro momento foi investigada a atividade catalítica da HRP na reação de oxidação do TMB através de diferentes soluções e monitorização das suas respetivas absorvâncias em espectroscopia de UV-Visível. Inicialmente os testes foram preparados conforme descrito no estudo [64], com TMB (816 μM), H_2O_2 (8,8 mM) e diferentes concentrações de HRP (0,010; 0,005 e 0,0025 $\mu\text{g/mL}$), em um meio com pH entre 3,5-4,5 e temperaturas entre 25-37 $^{\circ}\text{C}$. Os testes realizados nestas condições apresentaram uma mínima revelação de cor (Fig.3.16), ou seja, valores de absorvância muito baixos, 0,06, 0,04 e 0,03 u.a respetivamente, sendo a máxima absorvância obtida bastante inferior para o que se pretende no futuro que é a avaliação da capacidade antioxidante de um composto fenólico neste meio.

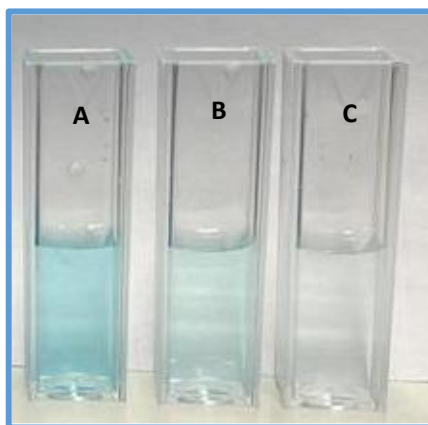


Figura 3.16 – Cuvetes resultantes da avaliação inicial das condições ótimas para reação de oxidação do TMB catalisada através da enzima HRP. Sendo A solução com HRP [0,01 $\mu\text{g/mL}$] e absorvância de 0,06 u.a; B solução com HRP [0,005 $\mu\text{g/mL}$] e absorvância de 0,04 u.a, e C solução com HRP [0,0025 $\mu\text{g/mL}$] e absorvância de 0,03 u.a.

Sendo assim, por consequência dos baixos valores de absorvância foram necessárias algumas alterações nas condições da reação. Manteve-se as condições de pH 4 e temperatura ambiente, porém alterou-se as concentrações de TMB e H_2O_2 para 400 μM e 4,0 mM respectivamente, e testou-se concentrações superiores de HRP (0,02; 0,03 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$), os resultados de absorvância com estas condições foram respectivamente 0,80; 1,19 e 2,31 u.a. Nesta situação, os valores de absorvância obtidos consoante as alterações realizadas já se enquadram com o que se pretende. De acordo com os resultados obtidos decidiu-se realizar os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante com a concentração de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de HRP, pois apresentou uma coloração azul adequada, inferior a 2 u.a, o que é imprescindível uma vez que o equipamento utilizado para as medições de absorvância resulta em saturação do sinal para absorvância superiores a 1,5 u.a, o que causaria um maior viés no resultado final. Sendo assim, foi definido que as concentrações dos compostos da reação são 400 μM de TMB, 4,0 mM de H_2O_2 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de HRP.

Depois de determinadas as condições ideais dos compostos da reação, fez-se uma avaliação do comportamento da absorvância da reação em relação ao tempo. A amostra foi analisada durante 10 minutos conforme apresentados os resultados na Figura 3.17. Os resultados confirmam que o tempo ideal para avaliação da reação são 2 minutos, uma vez que após esse tempo as absorvâncias obtidas ultrapassam 1,5 u.a e apresentam maior viés, além disso, foi detetado com que com passar do tempo, a partir de 3 minutos ocorre a formação de particulados na solução (Fig.3.18), situação que também afeta a avaliação da absorvância.

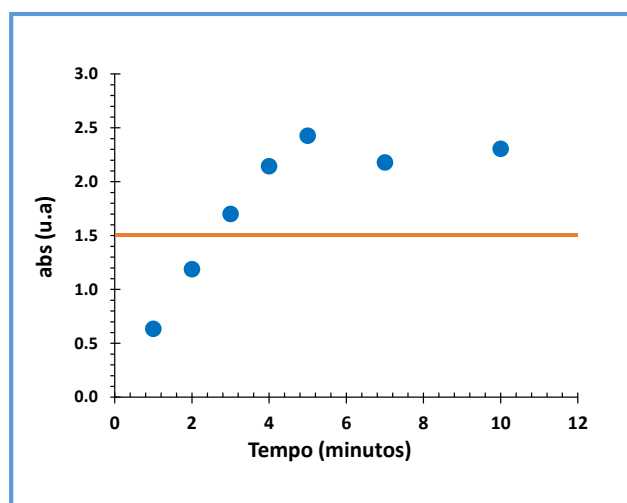


Figura 3.17 - Avaliação da absorvância da reação de oxidação do TMB (400 μM de TMB; 4,0 mM de H_2O_2 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de HRP) em relação ao tempo, para determinação do tempo ideal de reação.

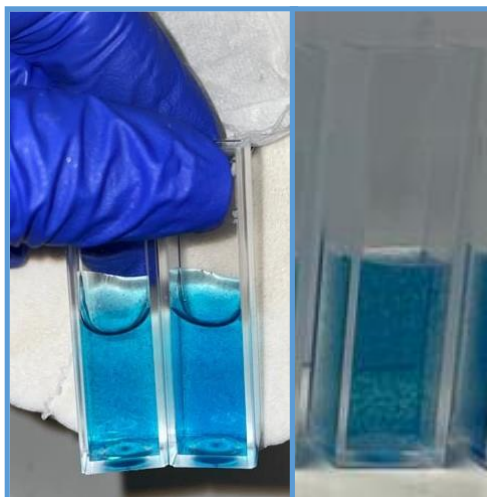


Figura 3.18 - Cuvetes de avaliação da reação em relação ao tempo, acima de 2 minutos com formação de particulados.

3.2 Determinação colorimétrica de compostos fenólicos - HRP

Como o ácido gálico e o ácido tânico são compostos fenólicos comumente encontrados em diversos produtos alimentares é importante avaliar as quantidades presentes destes antioxidantes, pois são compostos com excelentes propriedades benéficas para a saúde, porém se estiverem em excesso podem apresentar efeito reverso. Sendo assim, justifica-se uma abordagem que permita realizar detecções em níveis μM . Neste estudo uma faixa de 10-200 μM de AG foi incorporado no sistema de reação, indicado no item 3.1, e a evolução das absorvâncias foi controlada conforme apresentado no espectro da figura 3.19A, onde comprova-se que com o aumento da concentração de AG o pico em 652 nm diminui gradativamente devido a capacidade antioxidante deste composto, interrompendo assim a reação de oxidação do TMB na presença do H_2O_2 . Ou seja, a solução vai perdendo a força corante azul conforme o aumento da concentração do composto fenólico. Uma relação linear foi estabelecida através dos máximos de absorvância em 652 nm para as diferentes concentrações de AG (Fig.3.19B), obtendo-se uma equação de $Y = -0,0140x + 0,960$, com um R^2 igual a 0,9856, com um LOD de 6,62 μM .

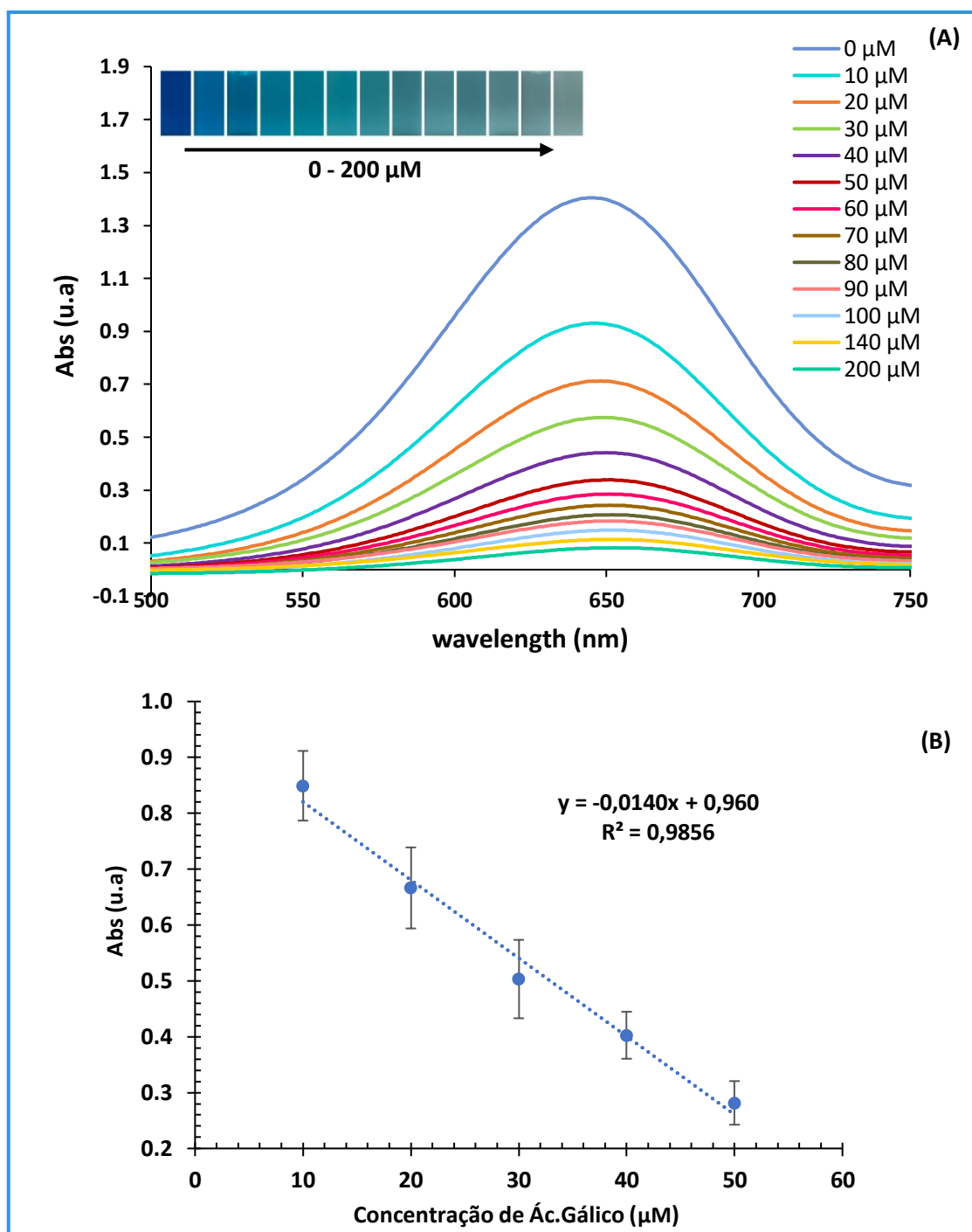


Figura 3.19 - Espectro de absorção (A) para reação com HRP e AG, e curva de calibração (B) para a determinação colorimétrica de AT entre 10 - 50 µM.

Também foi estudada uma faixa de 0,5-10 µM de ácido tânico incorporado no sistema de reação apresentado no item 3.1. O comportamento da reação também foi avaliado através das absorvâncias, o espectro é apresentado na Figura 3.20A onde comprova-se que com o aumento da concentração de AT, os picos em 652 nm diminuem, o que é esperado uma vez que o composto atua como antioxidante, ou seja causa uma redução significativa na intensidade da cor azul, enquanto amostras com menor

concentração apresentam uma resposta de cor azul intensa. Uma relação linear foi estabelecida através dos máximos de absorvância em 652 nm para as diferentes concentrações de AT (Fig.3.20B), obtendo-se uma equação $Y = -0,153x + 1,0677$, com um R^2 igual a 0,9912 e um LOD de 0,41 μM .

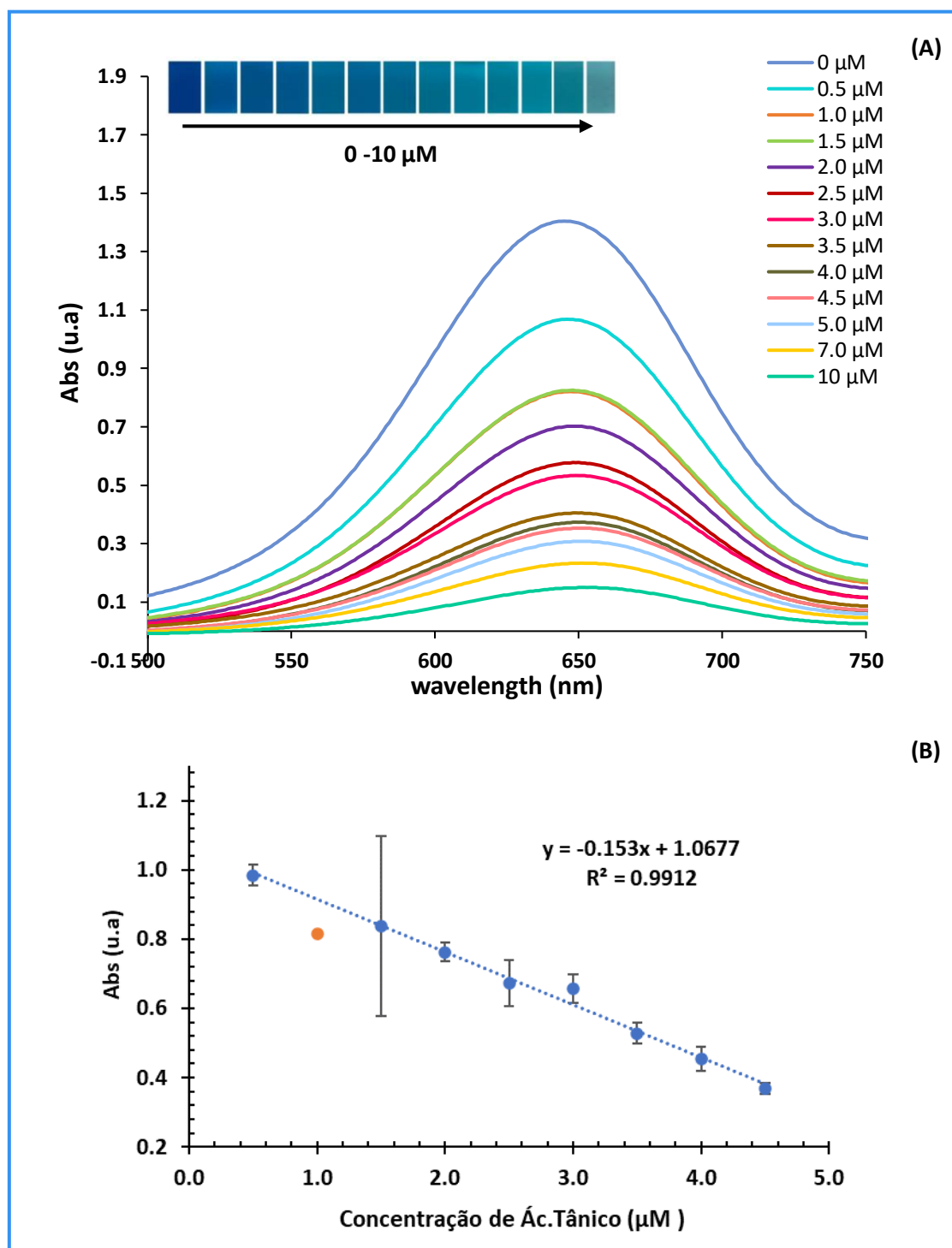


Figura 3.20 - Espectro de absorção (A) para reação com HRP e AT, e curva de calibração (B) para a determinação colorimétrica de AT entre 0,5 – 4,5 μM .

3.3. Otimização das condições da reação - NcAP

A atividade do nanomaterial selecionado para mimetizar a peroxidase foi investigada através da reação de oxidação do TMB na presença de NcAP com H_2O_2 , com objetivo de ocorrer a formação de um produto azul. Este estudo foi realizado com quatro diferentes sistemas de reação, com diferentes componentes (Fig.3.21), porém as condições gerais como concentração de TMB, H_2O_2 , pH e temperatura foram mantidas conforme o ensaio com HRP descrito no item 3.1. Conforme mostrado na Figura 3.21, na reação com participação dos NcAP (cuvete A) observou-se a formação de uma coloração azul perceptível o que significa que o nanomaterial tem capacidade de catalisar a reação de oxidação do TMB na presença de H_2O_2 . No entanto, os outros três diferentes sistemas de reação (B, C e D) não apresentaram desenvolvimento de cor na ausência de NcAP e/ou H_2O_2 , indicando assim que ambos os constituintes são essenciais para a reação de oxidação catalítica. Sendo assim estes resultados confirmaram que NcAP exibiu uma atividade intrínseca do tipo HRP.

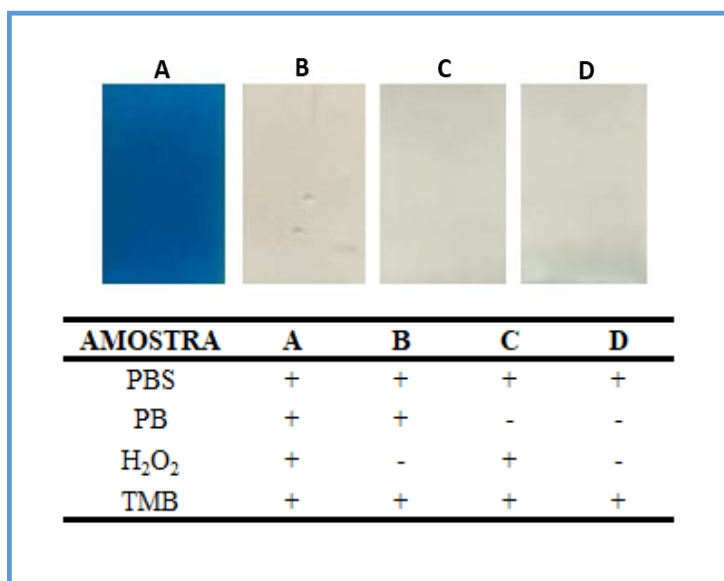


Figura 3.21 - Representação visual da cuvete dos diferentes sistemas de reação: (A) PBS (buffer) + NcAP + H_2O_2 + TMB; (B) PBS + NcAP + TMB; (C) PBS + H_2O_2 + TMB; (D) PBS + TMB.

Depois de confirmado que o material escolhido mimetizava a atividade da HRP foram testadas as condições indicadas no item 3.1 para diferentes concentrações de NcAP (0,01; 0,009; 0,006 e 0,003 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). O espectro de absorvância para as diferentes concentrações é apresentado na Figura 3.22, sendo o valor máximo de absorvância obtido para um valor de concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$, de $\pm 1,1$ u.a, valor considerado como ótimo para seguimento da metodologia, pois é adequado aos objetivos

futuros de avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos. Foram avaliadas outras concentrações de NcAP, porém as absorvâncias ultrapassavam 1,5, o que não é recomendado por consequência do viés causado pelo equipamento. Também foi avaliado o tempo de reação, que neste caso também ficou definido como 2 minutos, uma vez que para tempos superiores os valores de absorvância ultrapassavam o limite de 1,5 u.a e apresentavam o mesmo problema de partículas suspensas, conforme citado anteriormente no sistema com HRP.

3.4 Determinação colorimétrica de compostos fenólicos - NcAP

Este estudo teve como objetivo reproduzir o que foi apresentado no item 3.2 porém utilizando a enzima artificial que em comparação com as naturais apresentam vantagens como facilidade para produção de grande escala e baixo custo. Para o AG foi considerada a mesma gama de concentrações de trabalho, entre 10-200 μM , adicionados na reação indicada no item 2.3.4. Sendo assim os valores de absorvância das diferentes soluções foram avaliadas e o espectro resultante é apresentado na figura 3.21A, onde comprova-se que quanto maior a concentração de AG, o pico em 652 nm apresenta também o comportamento espectável de diminuição devido a capacidade antioxidante, causando uma diminuição na tonalidade de azul da reação. Neste sistema também foi estabelecida uma relação linear através dos valores máximos de absorvância para as diferentes concentrações de AG (Fig.3.22B), obtendo-se uma equação de $Y = -0,0106 x + 0,704$, com um R^2 igual a 0,9861, com um LOD de 5,63 μM .

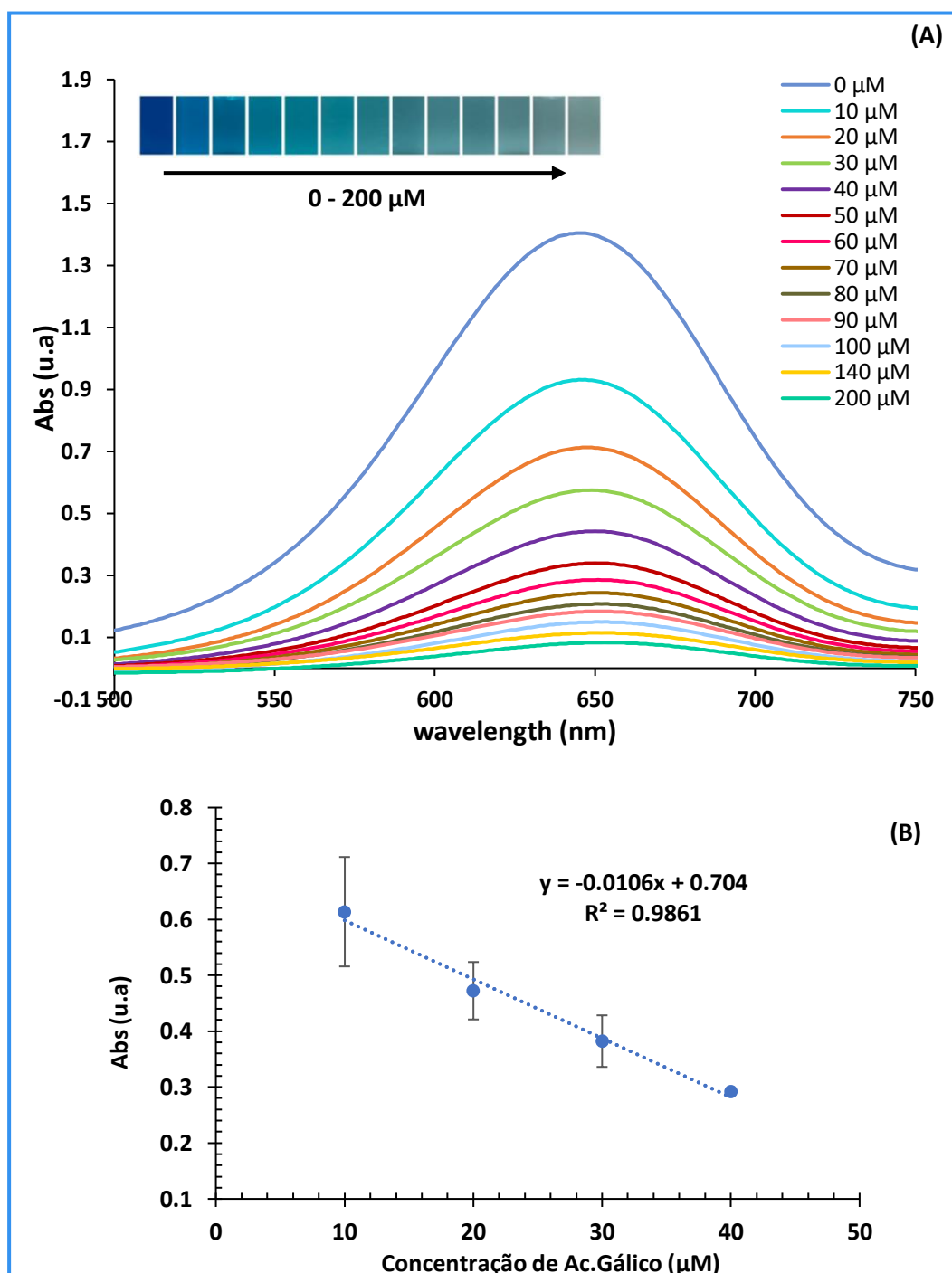


Figura 3.22 - Espectro de absorção (A) para reação com NcAP e AG, e gráfico de calibração linear (B) para a determinação colorimétrica de AG de 10-40 μM .

Também foi realizado o estudo para o ácido tânico, em uma faixa de 1,0-20 μM . O comportamento da reação foi monitorado em termos de absorvância conforme apresentado no espectro da Fig.3.23A. O espectro apresenta o comportamento esperado, ou seja, de diminuição dos valores de absorvância consoante ao aumento da concentração de AT, causando assim uma diminuição da intensidade da cor azul da solução. Uma relação linear foi estabelecida através dos máximos de absorvância em 652 nm para as

diferentes concentrações de AT (Fig.3.23B), obtendo-se uma equação $Y = -0,0471x + 0,9539$, com um R^2 igual a 0,9769, com um LOD de 1,51 μM .

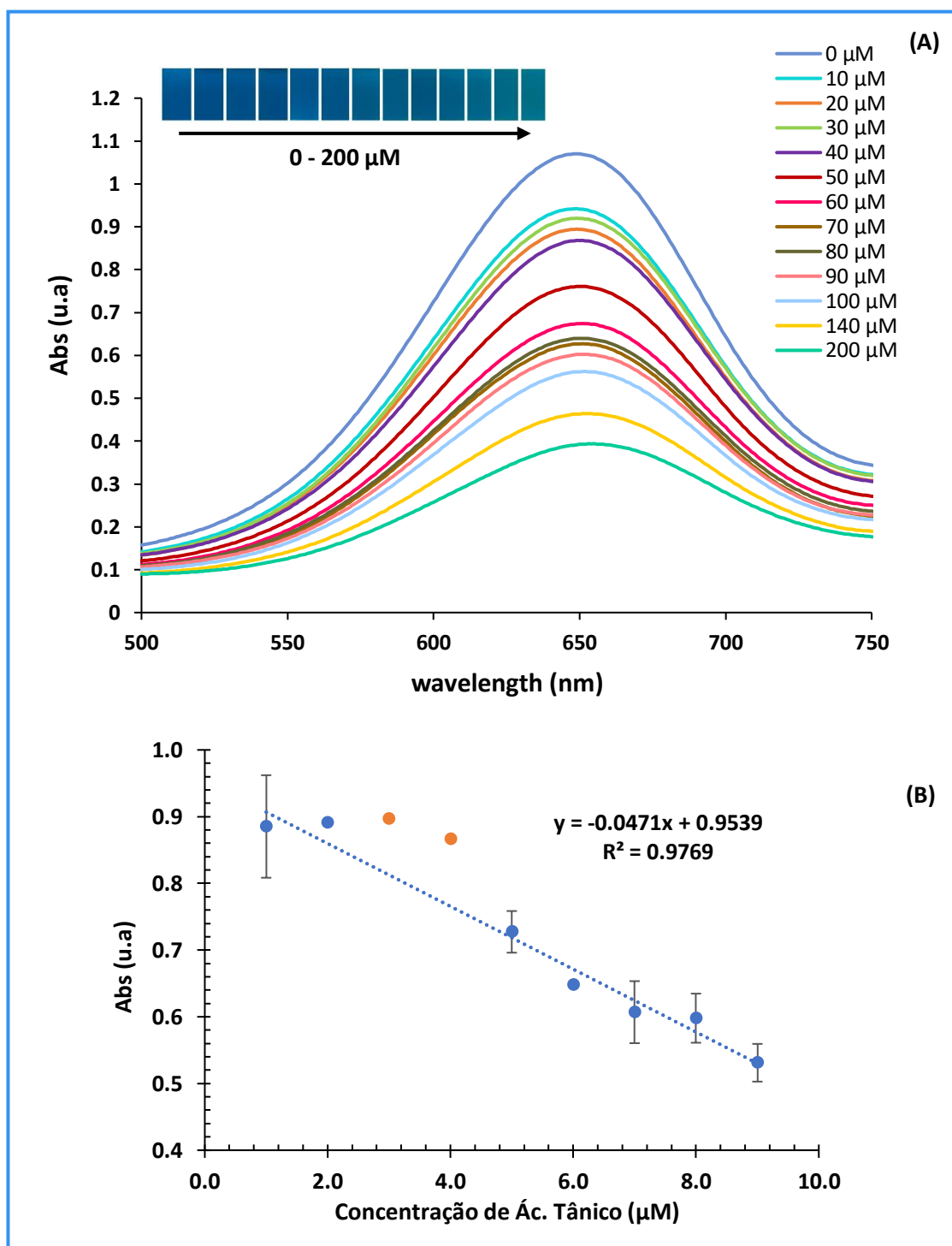


Figura 3.23 - Espectro de absorção (A) para reação com NcAP e AT, e gráfico de calibração linear (B) para a determinação colorimétrica de AG de 1-9 μM .

3.5. Análise de amostras reais pelos métodos de HRP e NcAP

As metodologias desenvolvidas permitem a obtenção de resultados relevantes que possibilitam estimar o conteúdo fenólico presente em uma amostra. Em bebidas comerciais podem estar presentes diferentes compostos fenólicos que podem contribuir para a quantidade global de antioxidantes presentes em uma certa bebida, neste caso as amostras foram avaliadas como equivalente de AG e AT.

É importante destacar que na maioria dos alimentos/bebidas não há a presença de um composto fenólico específico, mas sim de uma mistura a qual pode ainda não ter sido totalmente caracterizada, além disso, muitas vezes o mesmo alimento pode apresentar diferentes composições em termos de polifenóis dentro das suas diferentes tipologias. Além da variedade, outros fatores que podem afetar o teor de compostos fenólicos nos alimentos são a maturação no tempo da colheita, fatores ambientais, o seu processamento e armazenamento. Sendo assim, devido a grande quantidade de polifenóis existentes e o número considerável de fatores que podem modificar as suas concentrações ainda não foram elaboradas/criadas tabelas de composição de alimentos em termos de concentrações de polifenóis, apenas algumas informações parciais são publicas com base em análises diretas de alimentos [33].

Desta forma, para verificação das amostras seguiram-se as metodologias descritas nos itens 2.3.2 e 2.3.4. De acordo com os resultados obtidos através da metodologia com HRP, apresentados na figura 3.24, as bebidas que apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos em termos de AG e AT foram as amostras de vinho tinto e chá verde, característica esperada uma vez que esses tipos de bebidas apresentam uma elevada capacidade antioxidante. Contudo, tal resultado também era esperado para a amostra de vinho branco, no entanto a análise desta amostra resultou em concentrações menores de compostos fenólicos.

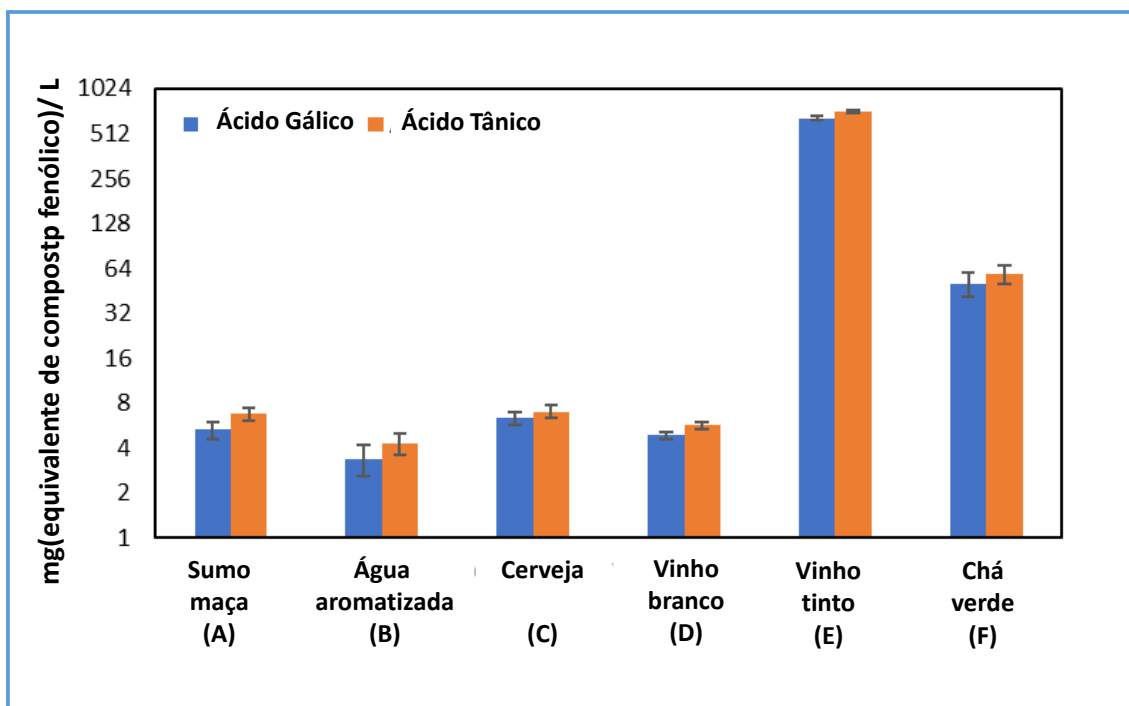


Figura 3.24 – Resultado dos teores de compostos fenólicos avaliados pelo método HRP em teores de ácido gálico (mg (ácido gálico)/L) [barras azuis]; e teores equivalentes a ácido tânico (mg (ácido tânico)/L) [barras laranjas] para diferentes bebidas comerciais com erros de três medições independentes, sendo A – Sumo de maçã; B – Água aromatizada; C – Cerveja; D – Vinho branco; E – Vinho tinto e F – Chá verde.

Os resultados das amostras analisadas conforme a metodologia com NcAP são apresentados na figura 3.25. Neste caso, os resultados encontrados variaram significativamente entre o ensaio com AG e AT, não permitindo uma análise concreta destes valores. O esperado seria um comportamento semelhante aos resultados do método com HRP (Fig.3.24), onde no mesmo método os teores calculados em equivalência de AG e AT não apresentam grandes variações. Apesar desta discrepância, as análises destas amostras seguindo o método com NcAP apresentam resultados promissores e por consequência disso através de algumas otimizações é possível e esperado corrigir essa diferença e aproximar os resultados aos obtidos no método com HRP.

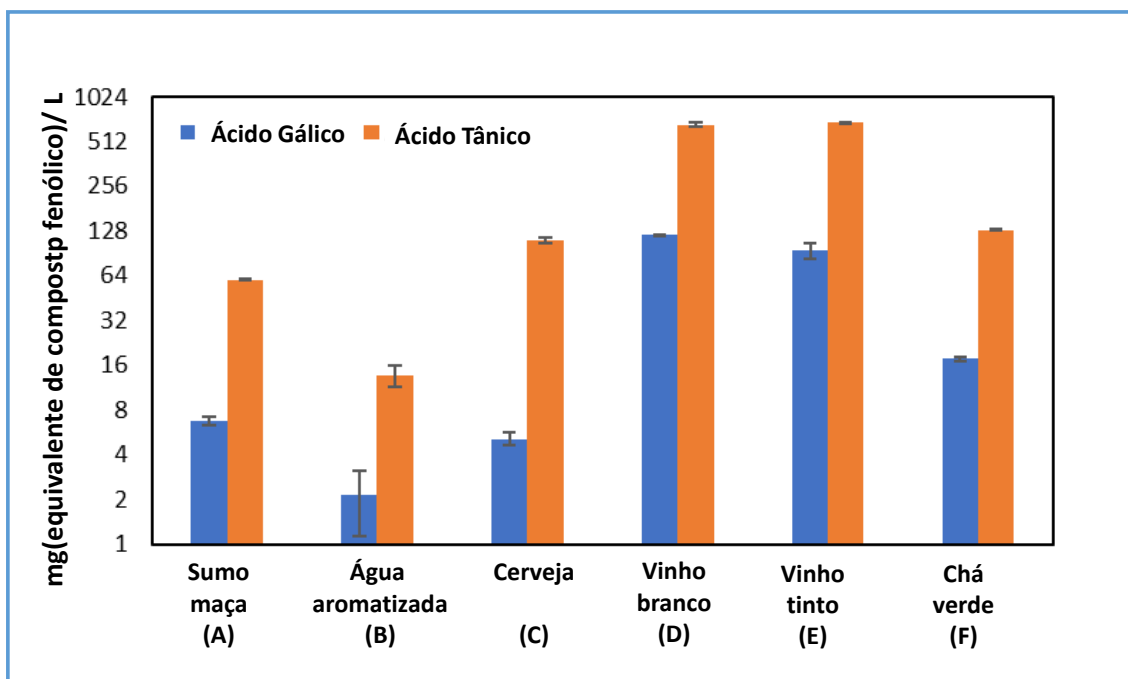


Figura 3.25 – Resultado dos teores de compostos fenólicos avaliados pelo método NcAP em teores de ácido gálico (mg (ácido gálico)/L)[barras azuis]; e teores equivalentes a ácido tânico (mg (ácido tânico)/L) [barras laranjas] para diferentes bebidas comerciais com erros de três medições independentes, sendo A – Sumo de maçã; B – Água aromatizada; C – Cerveja; D – Vinho branco; E – Vinho tinto e F – Chá verde.

Em relação aos teores de compostos fenólicos encontrados, ambos os resultados dos dois métodos são inferiores aos teores encontrados na literatura para os mesmos tipos de bebidas comerciais (sumo maçã (± 339 mg equiv.comp.fenólico/L); chá verde (61-220 mg equiv.comp.fenólico/g matéria seca); cerveja (452-875 mg equiv.comp.fenólico/L); vinho branco (191-296 mg equiv.comp.fenólico/L); vinho tinto (± 1615 mg equiv.comp.fenólico/L)) [14][66]. Isto é, são inferiores aos valores teoricamente esperados para estes tipos de bebidas. Porém existem diversos fatores que podem estar a causar estas diferenças, uma vez que os resultados descritos na literatura são para os mesmos tipos de bebidas, mas de regiões e marcas diferentes das amostras analisadas neste trabalho. Consequentemente, como o teor de compostos fenólicos é sensível a essas variações, o ideal seria analisar também as amostras com uma metodologia já conhecida e comumente usada para a determinação de compostos fenólicos, como o Folin-Ciocalteu ou a cromatografia, garantindo assim que a comparação será realizada para as mesmas amostras, com um tratamento semelhante, eliminando os erros existentes com as comparações gerais.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de uma metodologia colorimétrica enzimática de origem biológica e sintética para avaliar a presença de compostos fenólicos em bebidas comerciais. Os parâmetros experimentais numa primeira fase foram testados de acordo com estudos descritos na literatura e posteriormente otimizados consoante as necessidades. Os parâmetros da reação como pH, temperatura e tempo foram estudados, sendo determinado que as melhores condições foram a pH 4, temperatura ambiente e um tempo de reação de 2 minutos, para ambas as metodologias. Para os componentes da reação, as concentrações ótimas foram 0,4 mM de H₂O₂ e 4,0 mM de TMB. Para a metodologia com HRP, foi determinada uma concentração de enzima igual a 0,03 µg/mL. O sistema preparado detetou com sucesso os compostos fenólicos com um LOD de 6,62 µM e 0,41 µM para AG e AT respetivamente, com uma boa linearidade, com R² de 0,9856 para AG e 0,9912 para AT.

Para a metodologia com NcAP, foi comprovado que o nanomaterial escolhido exibe uma atividade intrínseca do tipo HRP, uma vez que avaliado em diferentes sistemas a presença da enzima e H₂O₂ são fundamentais para o desenvolvimento da cor. Para essa metodologia foi determinada uma concentração de 0,01 µg/mL de NcAP e as demais condições da reação foram mantidas conforme realizado para HRP. Neste caso os compostos fenólicos foram determinados com um LOD de 5,63 µM para AG e 1,51 para AT, indicando uma boa linearidade, com valores de R² de 0,9861 e 0,9769 respetivamente.

A partir destas metodologias as bebidas comerciais foram avaliadas e os resultados encontrados são considerados promissores para um futuro uso em aplicação prática para determinação destes compostos. Contudo, a metodologia precisa de otimizações principalmente na etapa de avaliação de amostras com NcAP. Como trabalho futuro recomenda-se otimizar essa análise e sugere-se para fins comparativos analisar também as amostras através de um outro método, como o Folin-Ciocalteu, pois não existem informações consistentes sobre o conteúdo de compostos fenólicos presentes nas amostras analisadas. Além disso, não é totalmente correta a comparação com valores encontrados na literatura por consequência da variabilidade destes teores. Outro estudo interessante para complementar o desenvolvimento da metodologia seria avaliar os

parâmetros cinéticos através das constantes de Michaelis-Menten para o substrato TMB e H_2O_2 para investigar a afinidade dos NcAP para eles, e comparar com a HRP.

5.REFERÊNCIAS

- [1] “Alimentação saudável: uma tendência em crescimento. Instituto de Marketing Research (IMR), 2019. <https://www.imr.pt/pt/noticias/alimentacao-saudavel-uma-tendencia-em-crescimento> (acesso Jan. 11, 2022).
- [2] Paula.O.A,Ramon; Santos.S.Eglaia; Pinto.F.Luciana et all: “Determinação da atividade antioxidante In vitro das bebidas de café e chás verde e preto,” J. Basic Appl. Pharm. Sci., vol. 36, pp. 167–171, 2015. <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/41/40> (acesso Jan. 11,2022).
- [3] N. Borah and C. Tamuly, “Ultrasensitive Pd nano catalyst as peroxidase mimetics for colorimetric sensing and evaluation of antioxidants and total polyphenols in beverages and fruit juices,” Talanta, vol. 238, p. 123000, Fev. 2022.
- [4] H. Jiang, W. Xu, and Q. Chen, “Determination of tea polyphenols in green tea by homemade color sensitive sensor combined with multivariate analysis,” Food Chem., vol. 319, p. 126584, Jul. 2020.
- [5] M. J. Cabrita, J. Ricardo-Da-Silva, and O. Laureano, “Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos,” 2003
- [6] “O Vinho,” 2016. <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-104-dezembro-2016/o-vinho.aspx> (acesso Jan. 21, 2022).
- [7] “Instituto da vinha e do vinho.” <https://www.ivv.gov.pt/np4/705/> (acesso Jan. 21, 2022).
- [8] F. Robaskewicz, B. Dambós.P, and N. Santim.C, “Determinação do teor de polifenóis totais e outras características físico-químicas em sucos de uva comerciais,” Unoesc & Ciência, vol. 7, pp. 159–166, 2016.
- [9] P. Martins.P and M. Nicoletti.A, “Polifenóis no vinho: resveratrol e seus benefícios,” Infarma ciências Farm., vol. 28, pp. 216–225, 2016.

https://repositorioaberto.up.pt/handle/10216/6812/browse?type=title&submit_browse=wse=Título. (acesso Jan. 21, 2022).

- [10] Portal do INE - "Dado de consumo humano de vinho," 2021. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contexto=pi&indOcorrCod=0000178&selTab=tab0 (acesso Jan. 21, 2022).
- [11] "Global Demand for Tea Is Growing Despite Sustainability Challenges,". <https://www.iisd.org/ssi/>. (acesso Jan. 21, 2022).
- [12] "Green tea - uses, side effects and more." <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-960/green-tea> (acesso Jan. 21, 2022).
- [13] S. Lopes.G.M, "Efeito da ingestão de 1g de chá branco, chá verde e chá preto na glicemia pós-prandial em indivíduos saudáveis após uma prova de tolerância oral à glucose," Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2014.
- [14] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," Food Chem., vol. 99, no. 1, pp. 191–203, Jan. 2006.
- [15] D.M.Zardo, "Avaliação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em maçãs e seus produtos." Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2007.
- [16] "5 Alimentos com polifenóis que deixam o seu corpo mais resistente." https://www.conquistesuavida.com.br/noticia/5-alimentos-com-polifenois-que-deixam-o-seu-corpo-mais-resistente_a11123/1 (acesso May.05,2022).
- [17] "Os principais ingredientes da cerveja." <https://www.ambev.com.br/blog/categoria/cerveja/os-principais-ingredientes-da-cerveja/> (acesso May.05,2022).
- [18] "Anatomia da cerveja." <https://www.superbockcasadacerveja.pt/anatomia-da-cerveja/> (acesso May.05,2022).

- [19] “Veja – A cerveja tem os mesmos benefícios para o coração que o vinho.” <https://veja.abril.com.br/saude/cerveja-tem-os-mesmos-beneficios-para-a-saude-que-o-vinho-diz-estudo/> (acesso May.05,2022).
- [20] “Cerveja e vinho ajudam coração e têm poder antioxidante.” <https://exame.com/tecnologia/cerveja-e-vinho-ajudam-coracao-e-tem-poder-antioxidante/> (acesso May.05,2022).
- [21] Portaria nº.703/96 – Diário da República; Série B – Ministério da Economia, da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas da Saúde e do Ambiente.
- [22] “Vitalis+” <https://www.vitalis.pt/gama/> (acesso May.05,2022).
- [23] I. C. Ferreira and R. Mv Abreu, “Stress Oxidati
- [24] T. Yoshikawa and Y. Naito, “What Is Oxidative Stress?,” JMAJ, vol. 45, no. 7, 2002.
- [25] D. J. Betteridge, “What is oxidative stress?,” Metabolism., vol. 49, no. 2 SUPPL. 1, pp. 3–8, 2000.
- [26] K.B.F.Barbosa; N.M.B.Costa; R.G.Alfenas et al., “Revista de Nutrição Oxidative stress: concept, implications and modulating factors,” Rev. Nutr, vol. 23, no. 4, pp. 629–643, 2010.
- [27] N. R. Sucupira, A. B. da Silva, G. Pereira, and J. N. da Costa, “Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos,” J. Heal. Sci., vol. 14, no. 4, pp. 263–272, 2012.
- [28] S. E. Soares, “Ácidos fenólicos como antioxidantes,” Rev. Nutr., vol. 15, no. 1, pp. 71–81, 2002.
- [29] A. Escarpa and M. C. Gonzalez, “An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods,” Crit. Rev. Anal. Chem., vol. 31, no. 2, pp. 57– 139, 2001.

- [30] B. H. Beal, “Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre” 2006. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/88395>. (Acesso Jan. 14, 2022).
- [31] A. Prado, “Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais,” Universidade de São Paulo (USP), 2009.
- [32] S. Karakaya, “Bioavailability of Phenolic Compounds,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 6, pp. 453–464, 2004.7
- [33] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: food sources and bioavailability,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, May 2004.
- [34] J. Zhao, I. A. Khan, and F. R. Fronczek, “Gallic acid,” *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online*, vol. 67, no. 2, Feb. 2011.
- [35] K. Yang et al., “Impact of Gallic Acid on Gut Health: Focus on the Gut Microbiome, Immune Response, and Mechanisms of Action,” *Front. Immunol.*, vol. 0, p. 2231, 2020.
- [36] R. Rosso, “Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico.” Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) , 2005. III
- [37] E. C. Rosas, L. B. Correa, and M. das Graças Henriques, “Antiinflammatory Properties of *Schinus terebinthifolius* and Its Use in Arthritic Conditions,” *Bioact. Food as Diet. Interv. Arthritis Relat. Inflamm. Dis.*, pp. 489–505, Jan. 2019.
- [38] “Tanino sob o microscópio | Tannins.org.” <https://www.tannins.org/tannin-underthe-microscope/> (acesso Jan. 16, 2022).
- [39] “Tanino: polifenol presente no vinho faz bem à saúde .” <https://www.ecycle.com.br/tanino/> (acesso Jan. 16, 2022).
- [40] H. Robles, “Tannic Acid,” *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, pp. 474–475, Jan. 2014.

- [41] J. A. Wilson, “The Natural Organic Tannins (Nierenstein, M.),” J. Chem. Educ., vol. 11, no. 12, p. 670, Dec. 1934.
- [42] S. Otles, Ed., Methods of Analysis of Food Components and Additives. 2005.
- [43] M. Naczki and F. Shahidi, “Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis,” J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 41, no. 5, pp. 1523–1542, Aug. 2006.
- [44] COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS - OIV. “Folin-Ciocalteu Index,” Method OIV-MA-AS2-10. Type IV method pp. 5–6.
- [45] “Polyphenols - Folin Ciocalteu .” <https://libios.fr/en/analytical-solutions/oxydative-stress-antioxidant-capacity/oxydative-stress-antioxidant-capacity-assay-kits/polyphenols-folin-ciocalteu> (acesso Jun. 12, 2022).
- [46] P. Magalhães.C, W. Rogrigues.A, and F. Durães.O.M, "Tanino no Grao de sorgo - Bases fisiológicas e métodos de determinação". EMBRAPA 1997.
- [47] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, and C. Pasquini, Principios de análise instrumental, 6th ed. 1998.
- [48] D. J. Daigle and E. J. Conkerton, “Analysis of Flavonoids by HPLC,” J. Liq. Chromatogr., vol. 6, no. sup1, pp. 105–118, Mar. 2006.
- [49] B. Sun, C. Leandro, J. M. Ricardo da Silva, and I. Spranger, “Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization,” Agric. Food Chem, 1998. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. (acesso: Jan. 17, 2022).
- [50] N. Mateus, A. M. S. Silva, J. Vercauteren, and V. De Freitas, “Occurrence of Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wines,” Agric. Food Chem., 2001.

- [51] M. A. Hidayat, N. Puspitaningtyas, A. A. Gani, and B. Kuswandi, “Rapid test for the determination of total phenolic content in brewed-filtered coffee using colorimetric paper,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 11, pp. 3384–3390, Oct. 2017.
- [52] M. Arciuli, G. Palazzo, A. Gallone, and A. Mallardi, “Bioactive paper platform for colorimetric phenols detection,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 186, pp. 557– 562, Sep. 2013. IV
- [53] Z. Hao et al., “Rapid measurement of total polyphenol content in tea by kinetic matching approach on microfluidic paper-based analytical devices,” *Food Chem.*, vol. 342, p. 128368, Apr. 2021.
- [54] C. Puangbanlang, K. Sirivibulkovit, D. Nacapricha, and Y. Sameenoi, “A paperbased device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples,” *Talanta*, vol. 198, pp. 542–549, Jun. 2019.
- [55] J.V.Nicolini, “Biossensores baseados em nanotubos de titanato e peroxidase para detecção do peróxido de hidrogênio”. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.
- [56] J.S.Silva, “Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: Estudos preliminares”. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- [57] Veitch.C.N, “Horseradish peroxidase: a modern view of classic enzyme”. *Phytochemistry*. vol. 65, pp. 249-259, Feb. 2004.
- [58] A.F.Naves, “Estudo da adsorção de herseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica”. Universidade de São Paulo. Instituto de Química, 2008.
- [59] “HRP Redox Reaction Driven TMB Color Development”. <https://www.immunochemistry.com/pages/hrp-redox-reaction-driven-tmb-color-development>. (acesso May. 06, 2022).

- [60] T.V.Dang, N.S.Heo, H.Cho, et al. “Colorimetric determination of phenolic compounds using peroxidase mimics based on biomolecule-free hybrid nanoflowers consisting of graphitic carbon nitride and copper”. *Microchimica Acta*, 188, 2021.
- [61] J.Estelrich, M.A.Busqueta. “Prussian blue: A nanoenzyme with versatile catalytic properties”. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
- [62] Cao, L.Y., et al., In situ Controllable Growth of Prussian Blue Nanocubes on Reduced Graphene Oxide: Facile Synthesis and Their Application as Enhanced Nanoelectrocatalyst for H₂O₂ Reduction. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2010. 2(8): p. 2339-2346.
- [63] Pattammattel, A. and C.V. Kumar, Kitchen Chemistry 101: Multigram Production of High Quality Biographene in a Blender with Edible Proteins. *Advanced Functional Materials*, 2015. 25(45): p. 7088-7098.
- [64] L.Gao, J.Zhuang, L.Nie, et al. “Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles”. *Nature Nanotechnology*. Vol.2. 2007.
- [65] H.Liu, Y.Ding, B.Yang, et al. “Colorimetric and ultrasensitive detection of H₂O₂ based on Au/Co₃O₄-CeO_x nanocomposites with enhanced peroxidase-like performance”. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Vol.271.2018: p.336-345.
- [66] R.N.P.Silva, J.F.Dias, M.G.B.Koblitz. “Carvejas: relação entre estilos; compostos fenólicos e capacidade antioxidante”. *Research Society and Development*. Vol.10.2021.