

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MARINA SPADACCIA ASCIUTTI**

**EFEITO DE INFUSÕES AQUOSAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS  
SOBRE O ESCURECIMENTO DA MAÇÃ E ATIVIDADE DA ENZIMA  
TIROSINASE ISOLADA DE *Agaricus bisporus***

**São Gabriel**

**2017**

**MARINA SPADACCIA ASCIUTTI**

**EFEITO DE INFUSÕES AQUOSAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS  
SOBRE O ESCURECIMENTO DA MAÇÃ E ATIVIDADE DA ENZIMA  
TIROSINASE ISOLADA DE *Agaricus bisporus***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte da avaliação no  
componente curricular do Bacharelado em  
Biotecnologia pela Universidade Federal do  
Pampa.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Posser

**São Gabriel**

**2017**

**MARINA SPADACCIA ASCIUTTI**

**EFEITO DE INFUSÕES AQUOSAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS  
SOBRE O ESCURECIMENTO DA MAÇÃ E ATIVIDADE DA ENZIMA  
TIROSINASE ISOLADA DE *Agaricus bisporus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa campus São Gabriel como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Posser

Trabalho de conclusão de curso aprovado em 27 de junho de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Posser (Orientadora)

Unipampa

---

M<sup>a</sup> Ilana Kemmerich Martins

Unipampa

---

M<sup>o</sup> Dennis Guilherme da Costa Silva

Unipampa

## RESUMO

Frutas e vegetais possuem nutrientes essenciais ao metabolismo humano, desta forma a deterioração desses nutrientes resulta na perda de qualidade dos alimentos. A perda de nutrientes é associada ao escurecimento enzimático ou não-enzimático. O escurecimento enzimático ocorre devido a alterações químicas decorrentes da ação de microrganismos deteriorantes, ou em resposta a oxidação de compostos fenólicos em polímeros coloridos devido ao contato com o oxigênio, catalisado pela ação da polifenol oxidase (PPO), também conhecida por tirosinase. O tipo e a concentração do substrato fenólico afetam diretamente o escurecimento enzimático. A PPO em contato com o oxigênio, oxida compostos fenólicos (como o Catecol), removendo hidrogênio de suas ramificações, e como produtos tem-se água e Quinona, a qual pode se condensar formando polímeros escuros e insolúveis, como a Melanina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de infusões aquosas das folhas de *Sida cordifolia* L. (malva), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), *Cynara scolymus* L. (alcachofra), *Bauhinia forficata* Link (pata de vaca), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) e *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), na inibição do escurecimento do suco de maçã, na inibição da atividade da tirosinase isolada de *Agaricus bisporus*, e analisar a interação das infusões com o metal Cobre, presente no sítio ativo da enzima. Foi avaliada a absorvância do suco de maçã em 400 nm ao longo de 5 minutos na presença e ausência de diferentes volumes de infusão. A atividade da tirosinase se deu pelo valor do delta de absorvância em 510 nm obtido ao final de 1 hora de análise. A análise da interação das infusões com o cobre foi realizada com base no espectro do cobre, no qual possui um pico de absorvância a 800 nm, e comparado com sua interação com o EDTA e o ácido ascórbico (quelantes já conhecidos). Foi observado que o chá verde, a pata de vaca, a carqueja e o guaco foram os mais eficientes em prevenir o escurecimento do suco de maçã. O chá verde, o guaco, a carqueja e a pata de vaca apresentaram melhor inibição da atividade da tirosinase. A interação com o cobre foi mais evidente para as infusões de chá verde, guaco, pata de vaca e alcachofra. O estudo demonstrou que infusões aquosas de plantas medicinais apresentam potencial para atuarem como agentes conservantes alimentícios via inibição da enzima tirosinase.

Palavras-chave: Frutas, oxidação, escurecimento enzimático, polifenol oxidase, interação enzimática, tirosinase.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MARINA SPADACCIA ASCIUTTI**

**AQUEOUS INFUSIONS OF DIFFERENT PLANT SPECIES EFFECTS ON APPLE  
BROWNING AND ISOLATED TYROSINASE ENZYME ACTIVITY OF *Agaricus  
bisporus***

**São Gabriel**

**2017**

## ABSTRACT

Fruits and vegetables have essential nutrient to human metabolism, therefore the deterioration these nutrients results on food quality loss. The nutrient loss associated to the enzymatic or no-enzymatic browning. The enzymatic browning occurs because of chemical alterations ensuring the microorganism deterioration activity or answering to phenolic compound oxidation into dark polymers and it caused by polyphenol oxidase (PPO) action, also known as tyrosinase. The phenolic substrate type and concentration directly affects enzymatic browning. The PPO in contact to oxygen, oxidize phenolic compounds (as Catecol), removing hydrogen from its branches, and as products has water and quinine, which can condense forming dark and insoluble polymers, such as Melanin. The aim of this work was to test the leaves aqueous infusions potential of *Sida cordifolia* L. (flannel weed), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), *Cynara scolymus* L. (artichoke), *Bauhinia forficata* Link (Brazilian orchid-tree), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (green tea) and *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), on browning apple juice inhibition, on the *Agaricus bisporus* isolated tyrosinase activity inhabitation, and analyze the infusions interaction with copper metal which is present on this enzymatic activity site. Were evaluated the apple juice absorbance at 400 nm for 5 min incubation in the presence and absence of different infusions volumes. The tyrosinase activity was given by delta absorbance at 510 nm obtained on the last of one hour analysis. The infusions interactions with copper was done based on copper spectrum which has a 800 nm absorbance peak, and compared with EDTA interaction and ascorbic acid (Chelanting ready known). Was observed that green-tea, Brazilian orchid-tree, carqueja and guaco were the most efficient to prevent the apple juice browning. The green-tea, guaco, carqueja and Brazilian orchid-tree demonstrated better tyrosine activity inhibition. The copper interaction was more clear to green-tea, guaco, Brazilian-orchid-tree and artichoke infusions. This study demonstrated that aqueous infusions of medicinal plants present potential to act as food preservative agents via the enzyme tyrosinase inhibition.

Keywords: Fruits, oxidation, enzymatic browning, polyphenol oxidase, enzymatic interaction, tyrosinase.

## Lista de Figuras

Figura 1: Reação de oxidação da melanina, catalisada pela tirosinase. ....	11
Figura 2: Síntese de melanina, a partir de tirosina, que ocorre nos melanócitos .....	13
Figura 3: Análise em espectrofotômetro da oxidação da PPO da maçã pelo aumento da absorbância a amostra.....	23
Figura 4: Análise da absorbância do suco de maçã em 400 nm na presença ou ausência de diferentes infusões .....	25
Figura 5: Análise comparada em espectrofotômetro da cinética enzimática da tirosinase na presença de infusões aquosas de seis espécies vegetais .....	27
Figura 6: Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de guaco com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico. ....	29
Figura 7: Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de pata de vaca com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico. ....	30
Figura 8: Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de alcachofra com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico. ....	31
Figura 9: Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de chá verde com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico .....	32
Figura 10: Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de carqueja com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico .....	33
Figura 11: Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de malva com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico. ....	34

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Composição dos alimentos .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Escurecimento dos alimentos.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Tirosinase.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Agentes anti-escurecimento utilizados na indústria .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Compostos naturais como inibidores da tirosinase. ....</b>	<b>14</b>
<b>1.6. Plantas medicinais utilizadas.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Objetivo específico .....</b>	<b>19</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Preparo das infusões.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Análise do escurecimento de <i>Malus domestica</i> frente à presença das diferentes infusões .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Análise da atividade da enzima Tirosinase isolada do fungo <i>Agaricus bisporus</i> ..</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Análise da interação do cobre com as infusões .....</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Análise estatística .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Atividade enzimática .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Análise dos efeitos das infusões sobre a atividade da enzima Tirosinase isolada do fungo <i>Agaricus bisporus</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Interação com o Cobre .....</b>	<b>28</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>38</b>
<b>Referências.....</b>	<b>40</b>



## 1. Introdução

### 1.1. Composição dos Alimentos

O bom funcionamento do metabolismo humano depende da incorporação de determinados nutrientes essenciais, e esses devem ser ingeridos diariamente. De modo que, uma dieta pobre não atenderá as necessidades metabólicas do organismo [1,2,3].

A ingestão de determinados alimentos, fornece ao organismo compostos bioativos que promovem benefícios a saúde e reduzem o risco de desenvolver doenças crônicas [1,2,3]. Esse efeito é atribuído a propriedades biológicas, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e hipocolesterolêmicas dos alimentos, e essas são associadas a nutrientes, como: os flavonoides, as catequinas presentes no chá verde e no vinho, as antocianinas dos frutos vermelhos, os flavonóis das folhas, as vitaminas C, A e E, entre outras [4, 5].

As vitaminas estão distribuídas na natureza em dois grupos: as hidrossolúveis (solúveis em água) funcionam como coenzimas, ou seja, necessitam de uma molécula orgânica como co-fatores, e modificam-se quimicamente ao decorrer da reação enzimática, são facilmente absorvidas e possuem armazenamento limitado, sendo necessária a ingestão em curtos períodos; e as lipossolúveis (solúveis em gorduras), onde, poucas de suas atividades fisiológicas são conhecidas, são absorvidas junto com as gorduras e exigem a presença de sais biliares no intestino, encontram-se armazenadas no fígado, e sua ingestão não precisa obrigatoriamente ser diária. Como exemplo de vitaminas hidrossolúveis temos o complexo vitamínico B, vitamina B1, niacina e niacinamida, vitamina B2, vitamina B6, ácido pantotênico, vitamina B12 e vitamina C (ácido ascórbico), e de vitaminas lipossolúveis temos o Retinol (vitamina A), vitamina E, vitamina D e vitamina K [2,3,6]. Dentre as vitaminas com importância na preservação de alimentos, a vitamina C, também conhecida por ácido ascórbico, é um poderoso antioxidante, que impede a oxidação por perda de elétrons. Essas moléculas sofrem oxidação antes que outras moléculas se oxidem, impedindo e protegendo as outras moléculas da oxidação. Funcionam como agente preservativo na indústria alimentícia, prevenindo a ação do tempo nos alimentos [3,7].

Os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante em frutos [8]. A maçã por exemplo, apresenta elevado teor de fitonutrientes, tais como flavonóides,

polifenóis e ácidos fenólicos, encontrados na polpa e principalmente na casca, e fornecem benefícios antioxidantes, atuando na redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, entre outras [9]. Os compostos bioativos da fruta in natura permanecem na biomassa fresca, mesmo após o processo de produção do suco. Os resíduos industriais oriundos da produção, são constituídos de uma mistura heterogênea de casca, semente, cálice, haste e polpa, e o estudo deste material de descarte é de extrema importância, tendo em vista que possivelmente contenham além de outros constituintes, compostos com propriedades antioxidantes [10, 11, 12].

Além dos compostos fenólicos e das vitaminas, os carotenoides têm demonstrado importante papel como antioxidantes. Precusores da vitamina A, o  $\beta$ -caroteno e seus derivados possuem um sistema de dupla ligação conjugada, responsável pela eficiência destes como antioxidantes [13].

## **1.2. Escurecimento dos alimentos**

A aparência dos alimentos é um importante indicativo de sua qualidade sendo um atributo considerado pelos consumidores na escolha de um produto. O escurecimento enzimático dos alimentos é um indicativo de injúrias físicas e fisiológicas que levam ao colapso e conseqüente deterioração celular causando mudanças indesejáveis, deterioração de aroma e outras propriedades organolépticas, além da diminuição do valor nutricional e da vida útil de muitos alimentos [7,14].

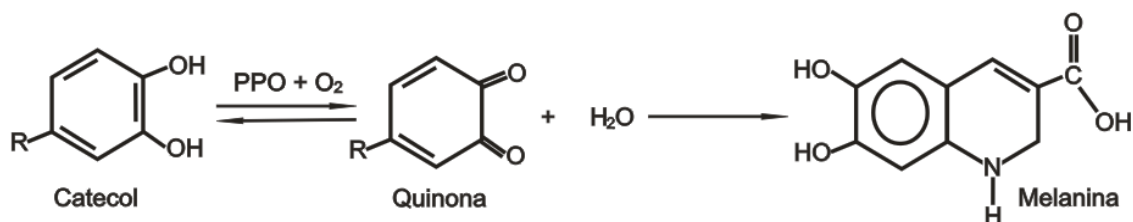
A maçã gala é uma das cultivares mais produzida no Brasil, e a rápida perda da qualidade está relacionada com os altos índices de produção de etileno dessa cultivar [15]. A aparência, o odor, a textura, o sabor e a cor, estão diretamente relacionados com o grau de maturação, e frequentemente a cor é um critério de decisão na escolha da fruta. A textura é outro fator de qualidade na maçã, sendo que está diminui com o tempo de armazenamento, devido ao escurecimento, e entre outras causas [16].

O escurecimento dos alimentos pode ocorrer de dois modos: por oxidação enzimática ou não-enzimática, de modo que, a oxidação não-enzimática dá-se pelas reações entre aminoácidos, peptídeos e proteínas com açúcares redutores e vitamina C (conhecida por reação de Maillard) [17]. Enquanto a oxidação enzimática dá-se por alterações químicas nos

alimentos, geralmente causadas por microorganismos deteriorantes ou pelo contato com o oxigênio [17, 18]. O escurecimento enzimático é causado principalmente pela ação da enzima polifenol oxidase, também conhecida por tirosinase, que quando em contato com o oxigênio, reage com compostos fenólicos (como o Catecol), removendo hidrogênio de suas ramificações, e como produto tem-se água e Quinona, a qual pode se condensar formando polímeros escuros e insolúveis, como a Melanina, resultando no escurecimento enzimático [18] (Figura 1). De tal modo, a concentração de oxigênio, o pH, a temperatura, o tipo e a concentração do composto fenólico afetam diretamente o escurecimento [19].

Compostos fenólicos encontram-se amplamente distribuídos no reino Plantae, e são considerados metabólitos secundários. Estruturalmente, possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, juntamente com outros substitutos. A composição fenólica de frutas e hortaliças varia de acordo com a espécie, cultivo, grau de amadurecimento e condições ambientais de desenvolvimento e de armazenamento. O tipo e a concentração do substrato fenólico afetam diretamente o escurecimento enzimático. [20].

**Figura 1:** Reação de oxidação da melanina, catalisada pela tirosinase.



Fonte: Artigo: Valéria Santos, Escurecimento Enzimático em Frutas, VII CONNEPI © 2012

### 1.3. Tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.1), também conhecida por polifenoloxidase (PPO), é uma metaloenzima que apresenta cobre em sua estrutura molecular e está presente em microorganismos, fungos, plantas e animais. A tirosinase desempenha um papel fundamental no processo de melanogênese, e é de total interesse a descrição das suas características, por ser uma enzima multifuncional, que se encontra amplamente distribuída na natureza. Até o momento, dentre as tirosinases já caracterizadas, as mais promissoras são as oriundas da estirpe *Streptomyces glaucescens* e dos fungos *Neurospora crassa* e *Agaricus bisporus*, de modo que, a enzima extraída e isolada do fungo *Agaricus bisporus* é a que apresenta maior semelhança estrutural com a tirosinase dos mamíferos [21, 22, 23].

Todas as tirosinases têm em comum um centro cúprico, com estado de oxidação III, composto por dois átomos de cobre, cada um coordenado com três resíduos de histidina e de natureza hidrofóbica. Os átomos de cobre presentes no centro ativo ligam-se ao oxigênio atmosférico e catalisam duas diferentes reações enzimáticas (I) *orto*-hidroxilação de monofenóis aos correspondentes *orto*-difenois e a respectiva (II) oxidação destes às correspondentes *o*-quinonas [21, 22, 23, 24, 25].

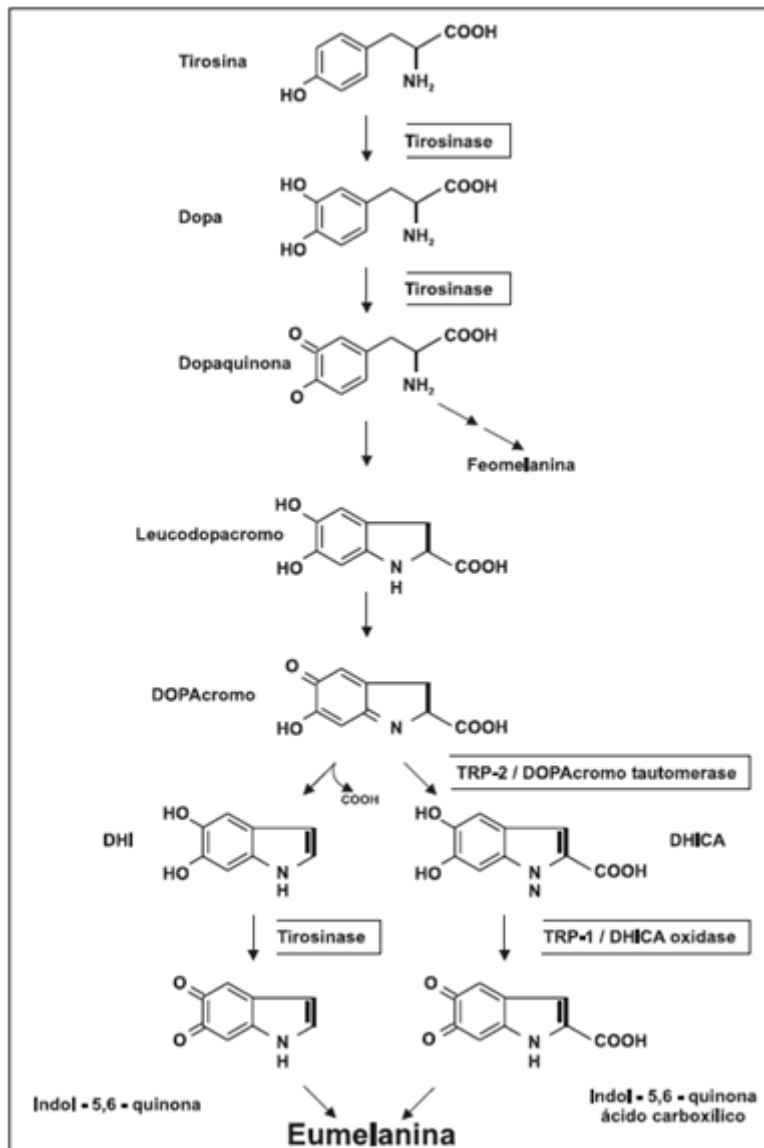
As quinonas também possuem ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, formando complexos com proteínas que atuam como barreira física para a penetração de patógenos, ou seja, os fenóis presentes nos ferimentos são oxidados para *o*-quinonas ou polímeros pela ação da tirosinase, estimulando a biossíntese destes fenóis e, conseqüentemente, o aumento da atividade desta enzima [26, 27].

Alterações no nível de atividade da tirosinase podem conduzir a desordens pigmentares, e estão associadas a doenças dermatológicas [28]. A despigmentação da pele e do cabelo é uma destas desordens e caracteriza-se pela reduzida produção de melanina, enquanto a hiperpigmentação da pele resulta da produção excessiva de melanina [21].

A reação inicial para a formação de melanina envolve a hidroxilação do substrato L-tirosina em 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), e a oxidação de DOPA em DOPAquinona, catalisada pela tirosinase, e com a liberação de uma molécula de água. A tirosinase catalisa também a oxidação de 5,6-dihidroindol (DHI) a indol-5,6-quinona. A enzima DOPAcromo tautomerase (TRP-2) converte o componente DOPAcromo para 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHICA). A enzima DHICA oxidase (TRP-1) catalisa a oxidação de DHICA a indol-5,6-quinona-2-ácido carboxílico (Figura 2) [29]. Ao final da reação, dois tipos de melanina podem ser formados: a feomelanina (amarela e vermelha) e a eumelanina (preta e marrom) [29, 30].

A L-tirosina é um dos 22 aminoácidos utilizados pelas células do corpo humano para sintetizar proteínas. Essa é produzida pelo próprio organismo, sendo assim, considerada um aminoácido não essencial, pois não é necessário o consumo dessa na alimentação. A L-tirosina é essencial na produção de neurotransmissores como, a epinefrina, a norepinefrina, L-DOPA e a dopamina, além de promover estímulos ao sistema nervoso central melhorando a disposição, concentração e produtividade [17]. Na indústria farmacêutica assume particular interesse por causa da síntese de *o*-difenois, como a dihidroxifenilalanina (DOPA) e a dopamina, indicados para o tratamento da Doença de Parkinson [21].

**Figura 2:** Síntese de melanina, a partir de tirosina, que ocorre nos melanócitos. Como produto final da reação há formação da eumelanina (pigmento preto ou marrom).



Fonte: Journal of Biological Chemistry, v. 267, p.23707-12, 1992.

As atividades de monofenol-hidroxilase e de difenol-oxidase reveladas pela tirosinase são de reconhecido interesse a nível industrial, nomeadamente ambiental, onde é usada na desintoxicação de águas residuais e solos contaminados com fenol e ainda como bio-sensor para a detecção e monitorização de compostos fenólicos [21]. Os fenóis, quando presentes em altas concentrações na água são poluentes difíceis de serem tratados, e normalmente são oriundos de resíduos descartados pelas indústrias têxteis, de plásticos, de papel e celulose, de tintas, refino de petróleo, entre outras [31]. Podem ser convertidos em alquifenóis,

clorofenóis, anilina, e outros intermediários secundários, utilizados na produção de antioxidantes, fertilizantes, surfactantes, tintas, tecidos e borrachas [32]. Os clorofenóis por exemplo, são recalcitrantes a biodegradação e persistem no meio ambiente, sendo assim, é de extrema importância que a indústria disponibilize uma forma de tratamento desses resíduos, à fim de degradar ou converter esses em substâncias menos nocivas antes do descarte [33, 34]

#### **1.4. Agentes anti-escurecimento utilizados na indústria.**

Indústrias alimentícias utilizam agentes que preservam a integridade do produto à fim de aumentar a vida útil do alimento produzido. A perda de qualidade nutricional dos alimentos é atribuída à destruição de aminoácidos essenciais e a uma diminuição da digestibilidade e a inibição de enzimas proteolíticas e glicolítica. Deste modo, a produção de compostos anti-nutricionais e tóxicos podem reduzir ainda mais o valor nutricional e possivelmente a segurança dos alimentos [17].

Os conservantes são de extrema importância em países tropicais, devido a acentuada deterioração dos alimentos pela umidade e pelas elevadas temperaturas, esses devem prolongar o tempo de conservação dos alimentos, protegendo-os de alterações decorrentes de microorganismos ou enzimas. A escolha do conservante deve ser feita com base no tipo de microorganismo a ser inibido, a facilidade de manuseio, o impacto no paladar, o custo e a sua eficiência [35, 36].

A indústria alimentícia utiliza agentes antioxidantes, como ácido sórbico (em produtos à base de batata e queijo), ácido benzóico (como antibacteriano e antifúngico em picles, compotas, molhos e condimentos), nitritos e nitratos (salsichas e fiambres como proteção contra bactérias do botulismo), e vários compostos sulfatados (antibacteriano em vinhos, frutos secos, vegetais em vinagre ou salmoura). Entretanto, os compostos sulfatados foram associados a alergias e alteração no sabor dos alimentos, e seu uso foi banido nos Estados Unidos pela agência Food and Drug Administration (US FDA, 1986) [17, 35, 37, 38].

#### **1.5. Compostos naturais como inibidores da tirosinase.**

Segundo a ANVISA, antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos, devem retardar a deterioração, rancidez e mudanças na

coloração decorrentes da auto-oxidação. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” [38]. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos [38, 39]

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: podem atuar como mecanismo de defesa contra os radicais livres, inibindo as reações em cadeia com o ferro e o cobre; são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular; os antioxidantes obtidos na dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e os carotenóides são extremamente importantes na inibição dos radicais livres [39, 40]; os eucariotos possuem enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase) que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo [41]; em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta (frutas e vegetais) é de grande importância e está relacionada com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres [42].

Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos [43], e a eficácia do antioxidante varia de acordo com o tipo de inibição [40].

A inibição enzimática pode envolver ligações reversíveis ou irreversíveis. A ligação reversível do inibidor à enzima pode ocorrer por ligação eletrostática ou por interação de *van der Waals*. Dependendo do sítio de ligação, do inibidor, da enzima e da presença ou ausência do substrato, os mecanismos de inibição enzimática podem ser divididos em três tipos [44]. Inibição competitiva, ocorre competição do inibidor e do substrato pelo centro ativo da enzima. Inibição não-competitiva, ocorre a formação prévia do complexo enzima-substrato. Inibição incompetitiva, ocorre a ligação do inibidor com o sítio ativo sem competição, efeito quelante [44,45].

O ácido kójico é o inibidor da tirosinase mais estudado, é um metabolito fúngico atualmente utilizado em cosmético para branqueamento da pele e como aditivo alimentar na prevenção do escurecimento enzimático. Esse apresenta um efeito inibitório competitivo sobre a atividade da monofenolase e um efeito inibitório misto sobre a atividade da

difenolase. A capacidade para quelar o cobre presente no sítio ativo da enzima explica bem o efeito inibitório competitivo observado [46, 47]. Estudos relatam que o uso frequente pode ocasionar aumento da sensibilidade da pele gerando casos de dermatite de contato [48].

A hidroquinona é um agente despigmentante que inibe a oxidação por meio de ligações covalentes as histidinas ou por interação com o cobre, impedindo a formação da melanina, deste modo, é utilizado como inibidor da tirosinase a décadas no tratamento de desordens hiperpigmentares, principalmente no tratamento de melasma, entretanto, é considerada citotóxica para melanócitos [49, 50, 51]. A arbutina, um derivado da hidroquinona é capaz de suprimir a biossíntese de melanina, a partir da interação com o cobre. Entretanto seu uso deve ser extremamente controlado, tendo em vista que, estudos em animais revelaram toxicidade a nível hepático, renal, mutagênico e carcinogênico [52, 53].

Os polifenóis e os flavonoides, apresentam semelhança química com a estrutura da tirosina. Devido à alta afinidade pelo cobre, promovem inibição por competição, assim bloqueando a melanogênese. Os flavonóides, possuem elevada bio-atividade e reduzida toxicidade, e encontram-se amplamente distribuídos em plantas, e apresentam compostos ativos com elevado potencial para uso cosmético [44, 54, 55].

O ácido ascórbico, possui efeito antioxidante, é um agente redutor que provoca a redução química da DOPAquinona, e é utilizado como um inibidor da melanogênese devido à sua capacidade para reduzir a o-dopaquinona para DOPA, evitando assim as formações de dopacromo e da melanina. Atua como quelante dos íons cobre do centro ativo da tirosinase, bloqueando desta forma a atividade enzimática [44, 54, 56].

O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) é um quelante clássico, pois possui elevada afinidade pelo cobre, agindo como quelante. Em estudos da atividade fisiológica e patológica de compostos dependentes de cobre, o EDTA foi frequentemente usado como quelante, pois liga-se ao cobre e impede eventos biológicos. A adição de EDTA não destrói o cobre do complexo, mas impede a formação de cupro-proteínas [57].

## **1.6. Plantas medicinais utilizadas.**

O Brasil possui uma vasta biodiversidade de espécies vegetais, que possuem compostos ativos com elevado potencial medicinal, apresentam propriedades curativas e/ou preventivas para determinadas doenças. O presente estudo utilizou seis espécies vegetais, de



plantas conhecidas pelo potencial medicinal, à fim de investigar se essas agem como inibidores da tirosinase. As espécies escolhidas foram:

*Baccharis trimera* (Less) DC., popularmente conhecida por carqueja, é uma planta nativa do Brasil, utilizada a séculos na medicina para o tratamento de várias doenças, principalmente, em problemas hepáticos e contra disfunções estomacais e intestinais, possuem propriedades anti-inflamatórias, digestivas, antioxidantes e antiúlcera, e podem estimular a vasodilatação e o relaxamento na musculatura lisa. Os principais compostos ativos presentes são os polifenóis, principalmente as proantocianidinas, e os flavonóides eupafolina, quercetina, luteolina, nepelina, apigenina, hispidulina, quercetina, eupatorina, genkwanina, cirsimaritina, rutina, cirsiliol, genkwanina, cirsimaritina, canferol, eupatrina [58, 59].

*Bauhinia forficata* Link, popularmente conhecida por pata de vaca, é uma planta nativa da Mata Atlântica, é uma espécie adequada para produção de celulose e suas folhas podem ser usadas para alimentação animal, é uma árvore de pequeno porte, entretanto pode atingir até 20 metros de altura. Na medicina é empregada no tratamento de diabetes e de diarreias, além de ser diurética, antisséptica e hipoglicemiante. Os principais constituintes químicos são os esteróis, os flavonóides (rutina e quercetina) pinitol, os taninos, os alcalóides e as cumarinas [60, 61].

*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, popularmente conhecida por chá verde, é uma planta nativa da Ásia e da Indonésia, amplamente cultivada na Índia, China, Sri Lanka, Japão e no Quênia. É mundialmente conhecida por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antibactericida e anti-arteriosclerose. É utilizada no tratamento auxiliar da cólera e outras diarreias de origem microbiana, prevenindo infecções intestinais, e é conhecida também por seus efeitos termogênicos e hipoglicêmicos. Seus principais compostos ativos são os polifenóis, principalmente as catequinas, os monosídeos de flavonóis e flavonas, e os taninos. Pesquisas a partir dos polifenóis demonstram atividades quimiopreventivas, como por exemplo, as epigallocatequina galato (principal catequina do chá-verde), que apresentam efeito anti-HIV quando acoplado ao receptor CD4 [62].

*Cynara scolymus* L., popularmente conhecida por alcachofra, é uma planta nativa do Mediterrâneo e do Norte da África, porém é cultivada no mundo todo, inclusive no Brasil. Possui propriedades colerética (favorece a secreção de bÍlis), colagoga (aumenta a produção de bÍlis), antianêmica, antiespasmódica, antidispéptica, hepatoprotetora e antitrombótica. Os principais constituintes químicos são os polifenóis, os flavonóides (luteolina, apigenina,

narigenina e a nariritina), os ácidos alifáticos (cítrico, fumárico, láctico, málico, succínico), carboidratos como a inulina, taninos, mucilagens, pectina, galactosamina, derivados das antocianinas e das cianidinas, cinarinas ou derivados do ácido cafeoilquínico. É rica em enzimas como a catalase, a oxidase, as peroxidases, a cinarase, a ascorbinase e proteases. Diversos estudos atualmente, buscam avaliar o potencial antioxidante dos componentes químicos da planta, por serem substâncias que podem limitar o stress oxidativo e restaurar as funções endoteliais [59, 63].

*Mikania glomerata* Spreng., popularmente conhecida por guaco, é uma planta nativa da América do Sul, utilizada na medicina há séculos devido às propriedades químicas das folhas, as quais incluem: ação tônica, depurativa, antipirética e broncodilatadora, além de ser estimulante do apetite e antigripal. É empregada no tratamento da asma, bronquite e no combate à tosse. Possui também propriedades anti-inflamatórias e antialérgicas. Apresentam como compostos ativos cumarinas, taninos hidrolisáveis, flavonóides e saponina, e modificações químicas nas cumarinas geram varfanina, um anticoagulante oral que atua como inibidor da vitamina K, um cofator essencial para a síntese de fatores de coagulação II, VII, IX e X [64, 65].

*Sida cordifolia* L. popularmente conhecida por malva ou malva-branca, é uma espécie arbustiva nativa da Índia e do Sri Lanka. É utilizada no tratamento da tosse, de irritações na garganta, de inflamações das vias respiratórias, bronquite asmática, congestão nasal, além de suas propriedades expectorantes e analgésica. Os principais compostos ativos são os alcalóides, os esteróides, os flavonóides, os fitoesteróis, as ligninas, as saponinas e os taninos, além da presença de proteínas e carboidratos, que auxiliam na redução de açúcares, gorduras e óleos. Apresentam também compostos fenólicos, que contribuem para a atividade antioxidante e antimicrobiana da planta [66].

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar e comparar o efeito inibitório de seis infusões aquosas de origem vegetal sobre escurecimento enzimático do suco de maçã gala *Malus domestica*, atividade da enzima tirosinase (*Agaricus bisporus*) e a interação das infusões com o metal cobre em comparação com o efeito quelante do EDTA e do ácido ascórbico.

### 2.2. Objetivo específico

- Investigar o efeito de infusões aquosas de *Sida cordifolia* L. (malva), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), *Cynara scolymus* L. (alcachofra), *Bauhinia forficata* Link (pata de vaca), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) e *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) sobre o escurecimento do suco de maçã (*Malus domestica*) variedade gala pela medida da absorbância ao longo do tempo;
- Avaliar a atividade da enzima tirosinase extraída do fungo *Agaricus bisporus* frente ao substrato tirosina na presença e ausência das diferentes infusões;
- Avaliar a possível interação das diferentes infusões com o metal cobre, através da análise do espectro de absorção do Cu e comparar com o EDTA e ácido ascórbico, já conhecidos pela interação direta com o cobre da enzima

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Preparação das infusões

Para o preparo das infusões, com auxílio de balança, 0,5 g de folhas de diferentes espécies vegetais obtidas comercialmente *Sida cordifolia* L. (malva), *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Cynara scolymus* L (alcachofra), *Bauhinia forficata* (pata de vaca), *Camellia sinensis* (chá verde) e *Baccharis trimera* (carqueja) foram pesadas, e posteriormente, foram infundidas em 15 ml de água destilada a 95°C em becker de vidro e o recipiente permaneceu tampado por 20 minutos de acordo com Narouani et al., 2007 [67]. Em seguida, o material foi coado com auxílio de papel filtro e funil. Sempre utilizou-se infusões frescas preparadas na ocasião do experimento sendo o excedente posteriormente descartado.

#### 3.2. Análise do escurecimento de *Malus domestica* frente à presença das diferentes infusões

Para investigar a ação das infusões sobre o escurecimento do suco de maçã, utilizou-se fatias de 8-10g de maçãs da espécie *Malus domestica*, maceradas em cadinho com 500 µL de água destilada e 500 µL de KCl 1mM pH 2,0 (meio ácido a fim de inativar a enzima), retirando apenas a parte líquida do macerado. Utilizando centrífuga *Eppendorf 5427 R*, as amostras foram centrifugadas a 4°C, com 14000 rpm por 5 minutos. 500 µL do sobrenadante foram adicionados à cubeta, e utilizou-se o espectrofotômetro *Agilent Cary 60 UV-Vis*. A metodologia foi adaptada de Klimczak e Swiglo [68]. A absorbância da amostra foi analisada durante 5 minutos no comprimento de onda 400 nm, à fim de observar a formação das quinonas. As infusões foram adicionadas em diferentes volumes na cubeta (50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL e 250 µL) e representados em % do volume total da cubeta (0, 10, 20, 30, 40 e 50 % respectivamente), em conjunto com o sobrenadante, mantendo sempre o volume final de 500 µL, para análise, avaliou-o a variação na absorbância em função do tempo (Delta de absorbância). (Figura 3,4). Para a presente etapa utilizou-se a variedade gala por ser a menos resistente ao armazenamento.

### 3.3. Análise da atividade da enzima Tirosinase isolada do fungo *Agaricus bisporus* frente à presença das diferentes infusões

A análise da atividade da enzima tirosinase foi avaliada de acordo com Teixeira et al., 2012 com algumas modificações levando em consideração o delta de atividade (60 min – tempo 0) representada pela absorbância em 510 nm, em espectrofotômetro *Agilent Cary 60 UV-Vis* [69]. Para isto, foram adicionados na cubeta 100 µL de tirosinase (*mushroom*) 125 U/mL, 150 µL de L-tirosina (0,3 mg/mL) e volumes variados (50 µL para 10%, 100 µL para 20%, 150 µL para 30% e 200 µL para 40%) das diferentes infusões. O volume final na cubeta foi mantido em 500µL, sendo este ajustado com diferentes volumes de tampão Kpi 50mM pH 6,8 (Tabela 1). A concentração de enzima e substrato foi obtida a partir de curva de cinética enzimática com diversas concentrações de enzima/substrato.

**Tabela 1.** Volumes utilizados na análise cinética da tirosinase em espectrofotômetro.

Tirosinase	L-tirosina	Tampão Kpi 50mM pH 6,8	Infusão
100 µL	150 µL	200 µL	50 µL
		150 µL	100 µL
		100 µL	150 µL
		50 µL	200 µL

### 3.4. Análise da interação do cobre com as infusões

A possível interação das infusões com o íon cobre o qual está presente no sítio ativo da enzima tirosinase [6,7] foi investigado através da análise do espectro de absorção de uma solução de sulfato de cobre 20 mM na presença das diferentes infusões baseado em Pereira et al., 2013 [70]. O espectro obtido foi comparado com o espectro resultante da interação do Cu + EDTA (20 mM) e Cu + ácido ascórbico (20 mM) e Cu + 100 µL das diferentes infusões. O espectro foi medido com absorbância entre 400 nm e 1100 nm, sendo que as cubetas apresentavam:

- 1ml de água destilada
- CuSO<sub>4</sub> 20 mM: 100 µL de CuSO<sub>4</sub> + 900 µL de água destilada
- EDTA 20mM: 200 µL de EDTA + 800 µL de água destilada
- 100 µL Cu + 200 µL EDTA + 700 µL de água destilada
- 100 µL de infusões + 900 µL de água destilada
- 100 µL de infusões + 100 µL Cu + 800 µL de água destilada
- 200 µL de ácido ascórbico + 800 µL de água destilada
- 200 µL de ácido ascórbico + 100 µL Cu + 700 µL de água destilada

### 3.5. Análise estatística

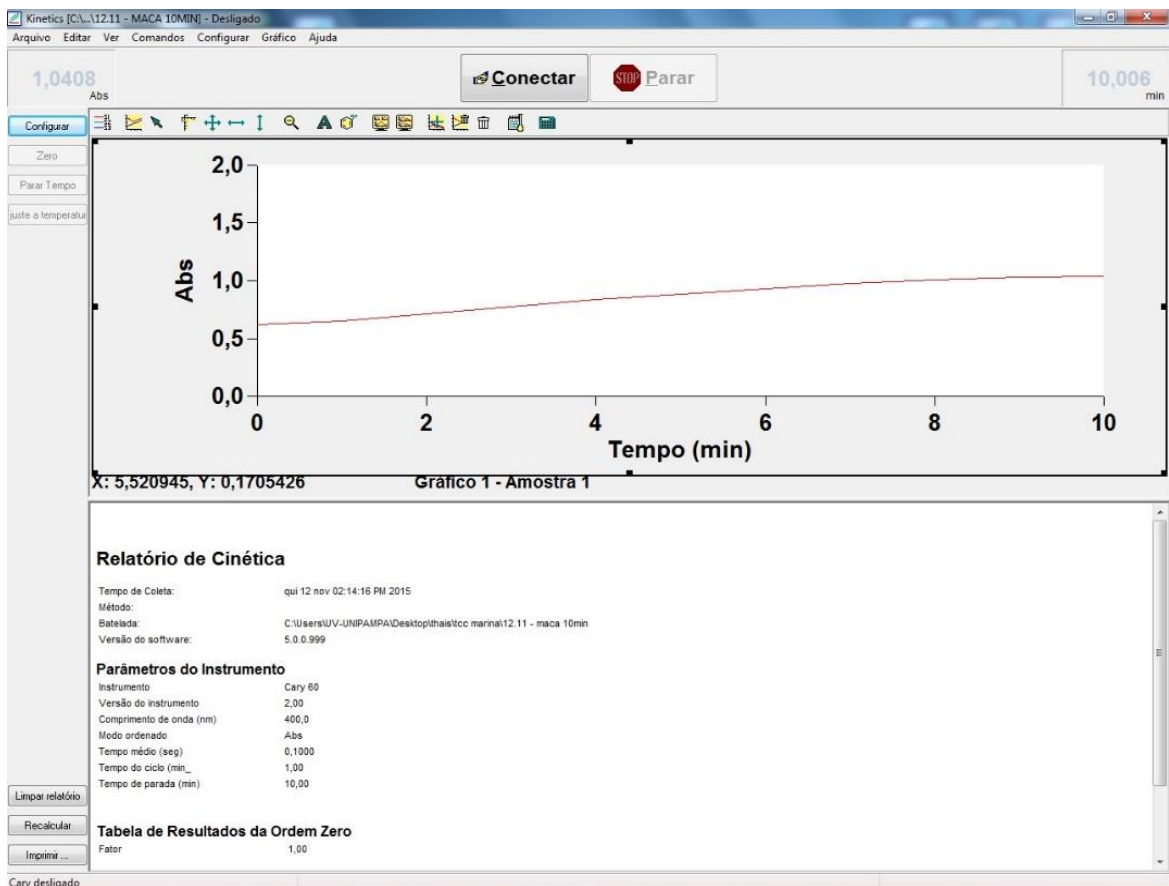
Todos os testes foram realizados em triplicata. Para análise dos dados utilizou-se o programa GraphPad Prisma 5.0. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o teste de ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* Tukey's. Considerou-se diferença significativa entre os grupos quando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Atividade enzimática

Para avaliar a capacidade das diferentes infusões protegerem o suco de maçã *Malus domestica*, contra o escurecimento, avaliou-se a absorvância do suco no decorrer do tempo na presença ou ausência dos chás. Inicialmente, avaliou-se a absorvância do suco de maçã somente no decorrer de 10 minutos, para encontrar o melhor período para análise (onde atingiu-se a absorvância máxima da amostra), em 400 nm (Figura 3). Como pode ser observado na imagem, após 10 min de análise obteve-se um delta de 0.04 (A final – A inicial). Para os demais experimentos, o tempo de 5 minutos de análise foi escolhido. (Figura 4). Optou-se pela absorvância de 400 nm a fim de observar a formação das catequinas.

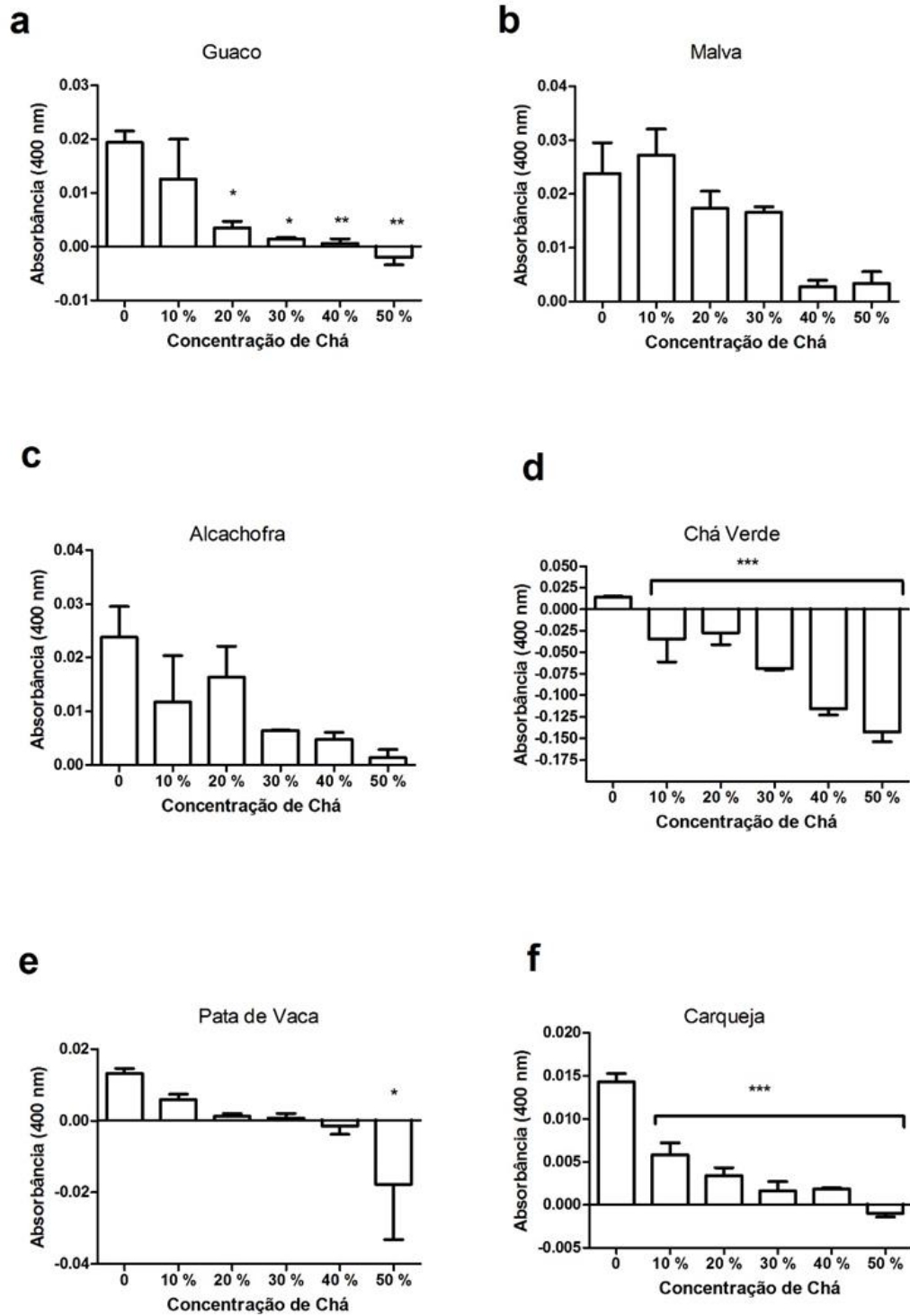
**Figura 3:** Análise em espectrofotômetro da atividade oxidativa da maçã gala, dada pelo aumento da absorvância a amostra. A curva representa o aumento da oxidação do extrato da polpa de maçã gala, com absorvância de 400 nm, com um  $\alpha$  resultante de 0,0474, e absorvância final de 1,0408.



Após o estudo da cinética de oxidação do suco, foi avaliado o efeito dos chás de folhas de diferentes espécies, (malva, guaco, chá verde, pata de vaca, carqueja e alcachofra) obtidos comercialmente, sobre a absorvência do suco. Volumes variados de cada infusão foram adicionados a cubeta em conjunto com a sobrenadante conforme descrito na metodologia. Dos seis chás analisados, o maior efeito inibitório sobre o escurecimento do chá de maçã foi demonstrado pelo chá verde (Fig 4d, o qual demonstrou total inibição da oxidação pelo chá já em volume de 10%, seguido pela pata de vaca, no qual observa-se elevada inibição a partir dos 20% (Fig 4e), guaco, onde a 30% é evidente a inibição (Fig 4a) e por último a infusão de carqueja, onde a inibição ocorre em 50% (Fig 4f). As infusões de alcachofra e malva não demonstraram diferença estatística em relação ao grupo controle (somente suco) (Figura 4c e b respectivamente)



**Figura 4:** Análise da absorbância do suco de maçã em 400 nm na presença ou ausência de diferentes infusões. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

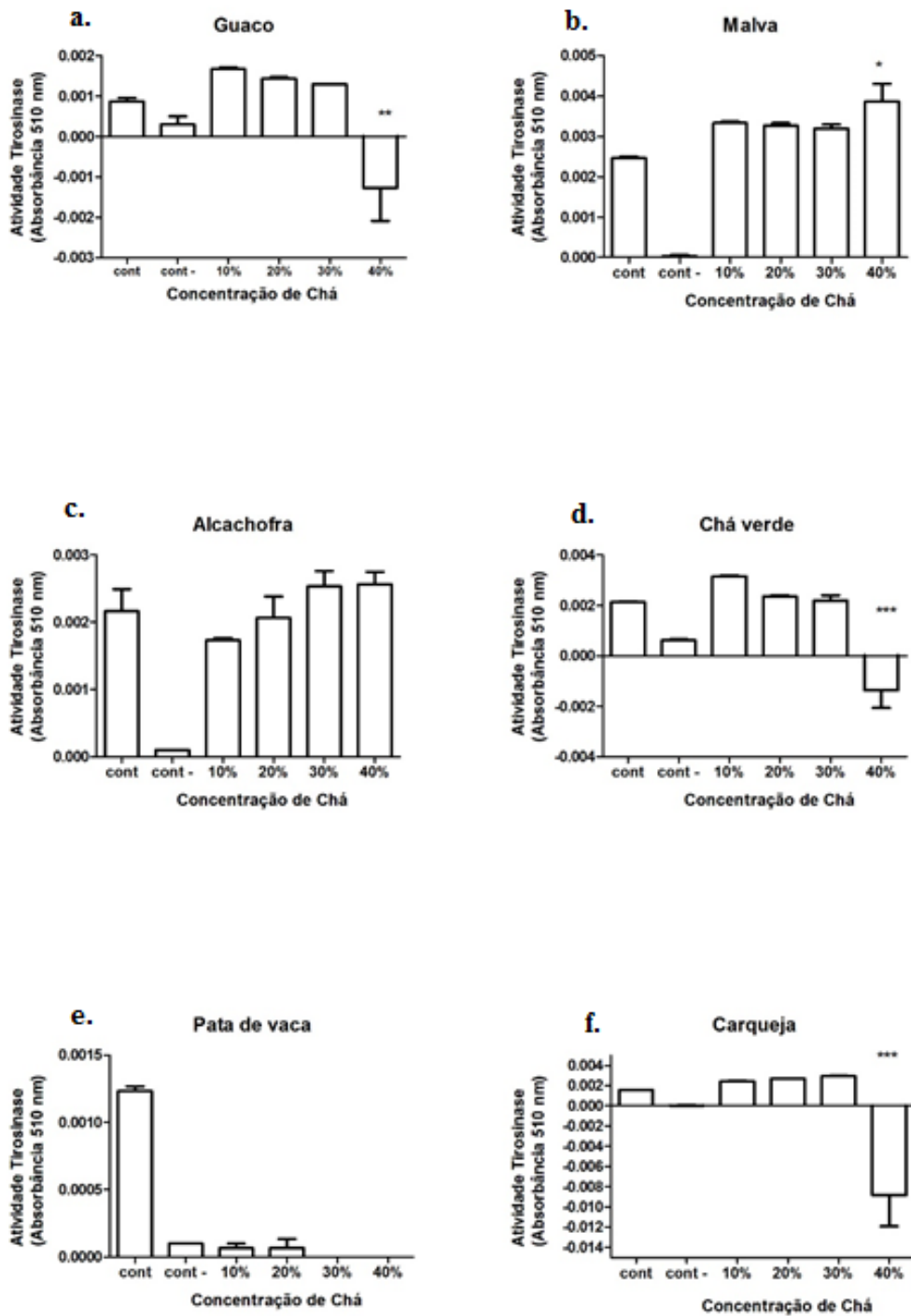


#### **4.2. Análise dos efeitos das infusões sobre a atividade da enzima Tirosinase isolada do fungo *Agaricus bisporus***

Tendo em vista que as diferentes infusões inibiram o escurecimento do suco de maçã, sendo a atividade polifenol oxidase (tirosinase) principal responsável por este processo, avaliou-se a cinética da atividade tirosinase purificada de *Agaricus bisporus* na presença ou ausência de diferentes infusões conforme descrito na metodologia, e o pH utilizado segue as especificações do fabricante da tirosinase. Primeiramente pipetou-se o tampão (Kpi 50mM pH 6,8) na cubeta, seguido da tirosinase (*Agaricus bisporus*), da L-tirosina e por último a infusão, e as variações nos volumes utilizados seguem os dados apresentados na Tabela 1.

Para a análise e construção do gráfico, utilizou-se dois grupos controle, um controle positivo (ausência da infusão - 250 µL tampão, 100 µL tirosinase e 150 µL de L-tirosina), e um controle negativo (ausência de tirosinase e de L-tirosina, contendo somente 300 µL de infusão e 200 µL de tampão Kpi 50mM pH 6,8), as demais seguem os volumes apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado na Figura 5e a pata de vaca demonstrou total inibição da atividade tirosinase, a partir do volume de 10%. As infusões de carqueja (5f), guaco (5a) e chá verde (5d) apresentaram potencial de inibição no volume maiores como 40%, enquanto que malva (5b) e alcachofra (5c) não foram eficazes em inibir a atividade da enzima.

**Figura 5:** Análise comparada em espectrofotômetro da cinética enzimática da tirosinase na presença de infusões aquosas de seis espécies vegetais. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .



### 4.3. Interação com o Cobre

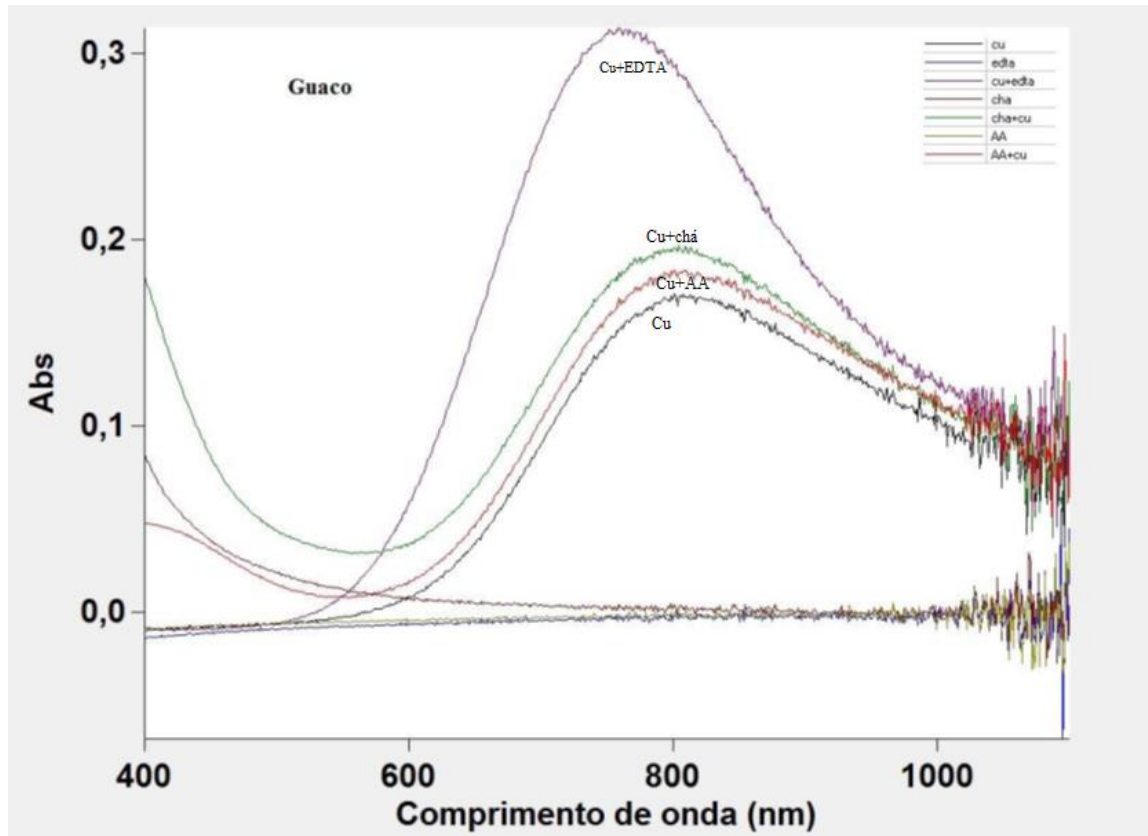
Tendo em vista que as diferentes infusões inibiram a atividade da tirosinase purificada de *Agaricus bisporus*, foi realizada a análise da interação das infusões com o cobre, à fim de demonstrar se as infusões interagem com o cobre presente no sítio ativo da tirosinase.

A inibição da atividade enzimática é um processo importante, que serve como mecanismo de controle dos sistemas biológicos, é levada a cabo por inibidores, substâncias que controlam o nível de atividade enzimática. A inibição pode ocorrer de duas formas: reversível e irreversível, sendo que o que as distingue é a facilidade de dissociação do complexo Enzima-Inibidor formado [44,45]. Na forma reversível de inibição verifica-se a rápida dissociação do complexo enzima-inibidor, em contraste com o que se verifica na inibição irreversível, onde a dissociação do mesmo complexo ocorre de forma lenta. Na inibição competitiva, uma forma de inibição reversível, o inibidor e o substrato têm estruturas semelhantes que competem pela ligação à enzima, que não ocorre simultaneamente. Na inibição não-competitiva, o inibidor não pode se ligar à enzima no estado livre, mas somente ao complexo Enzima-Substrato [44]. O complexo Enzima-Inibidor-Substrato formado é enzimaticamente inativo, é um tipo de inibição raro, mas pode ocorrer em enzimas multiméricas. Os inibidores não-competitivos, fazem uma inibição do tipo reversível, podem se ligar à enzima ao mesmo tempo que o substrato, ou seja, nunca se ligam ao sítio ativo [14].

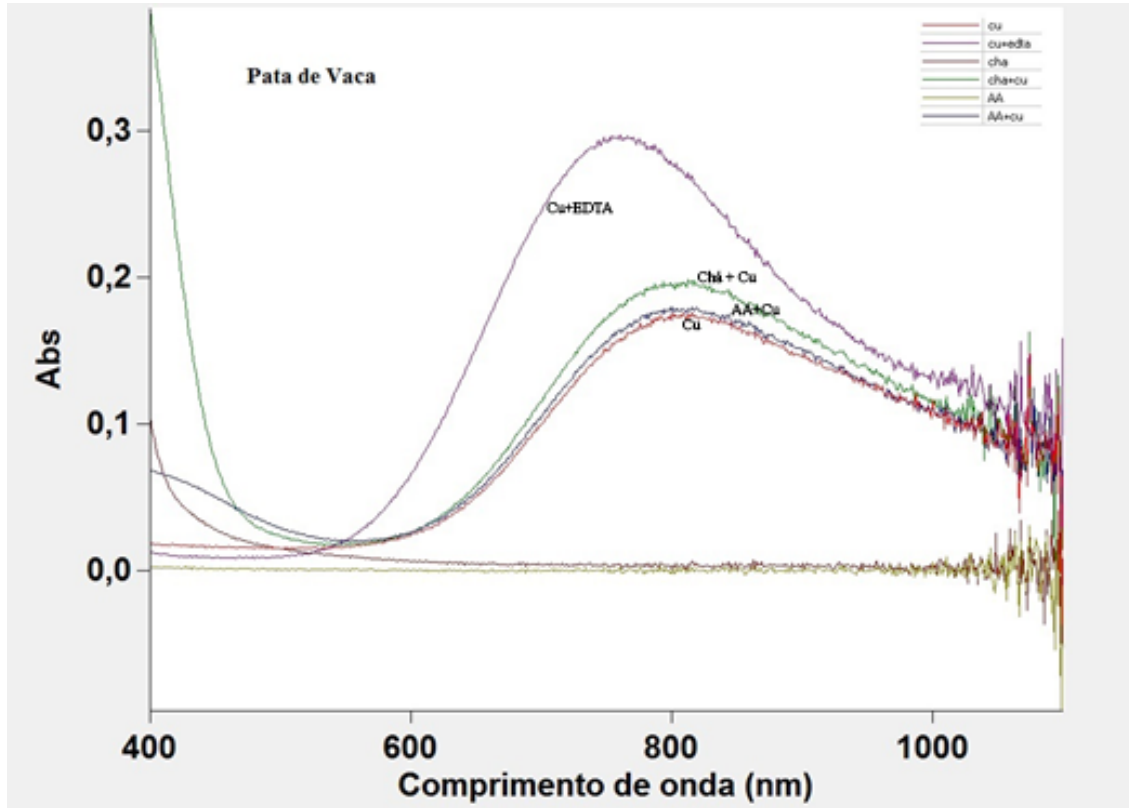
Visando a possível interação das infusões como inibidores da tirosinase pela ligação com o cobre presente no sítio ativo. Foram utilizados para a presente análise dois controles, o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), um quelante clássico que possui alta afinidade pelo cobre, e o ácido ascórbico (AA), também conhecido por interagir com o cobre ativo da enzima, inibindo a atividade da tirosinase. A figura 6 mostra a interação da infusão de guaco com o cobre, e a mudança na curva do espectro do cobre prova que ocorre interação entre eles. O aumento na absorbância da solução no comprimento de onda de 800nm, comparado com o efeito no espectro de absorção do Cu/EDTA e Cu/AA, demonstra um valor de absorbância do Cu/infusão de guaco intermediário aos controles. O mesmo foi observado para a infusão de pata de vaca (fig 7), alcachofra (fig 8) e chá verde (fig 9). Entretanto, a infusão de carqueja (fig 10) na presença de Cu apresentou menor absorbância quando

comparado ao Cu/AA, e enquanto a infusão de Malva não alterou a absorbância do Cu (fig 11).

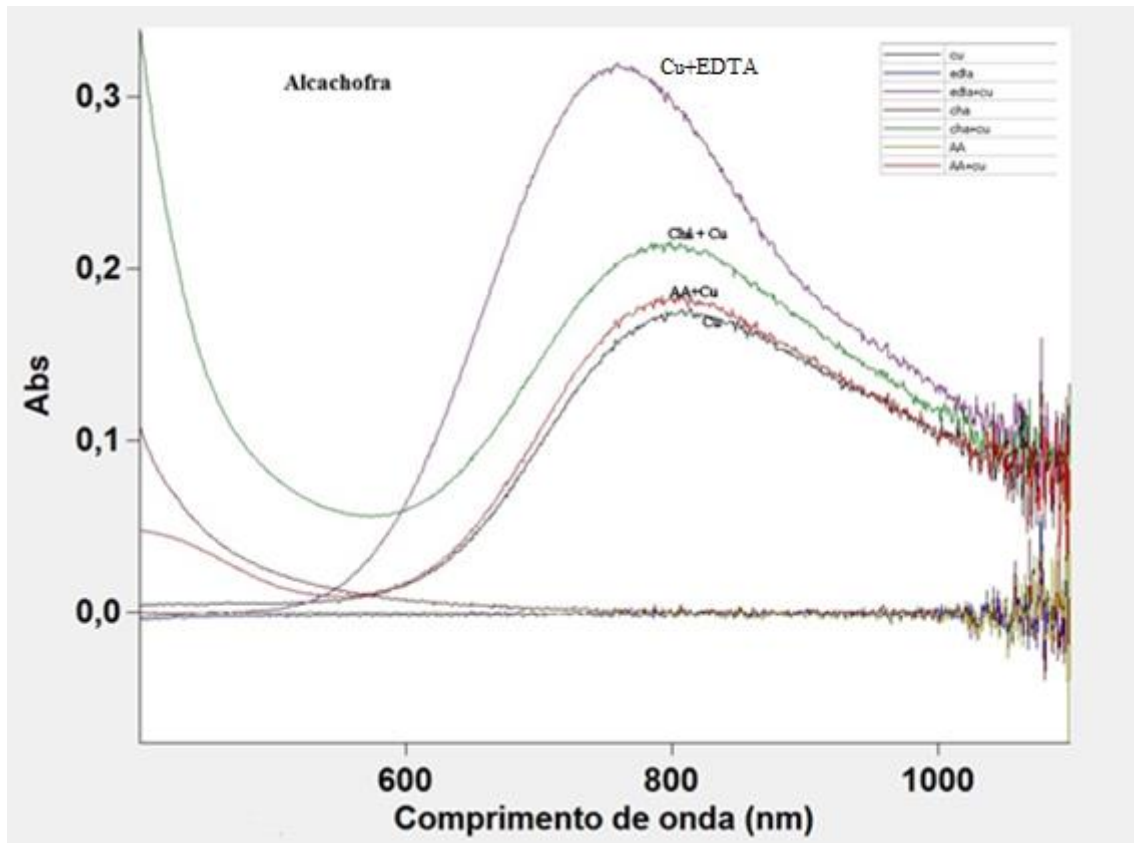
**Figura 6:** Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de guaco com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico.



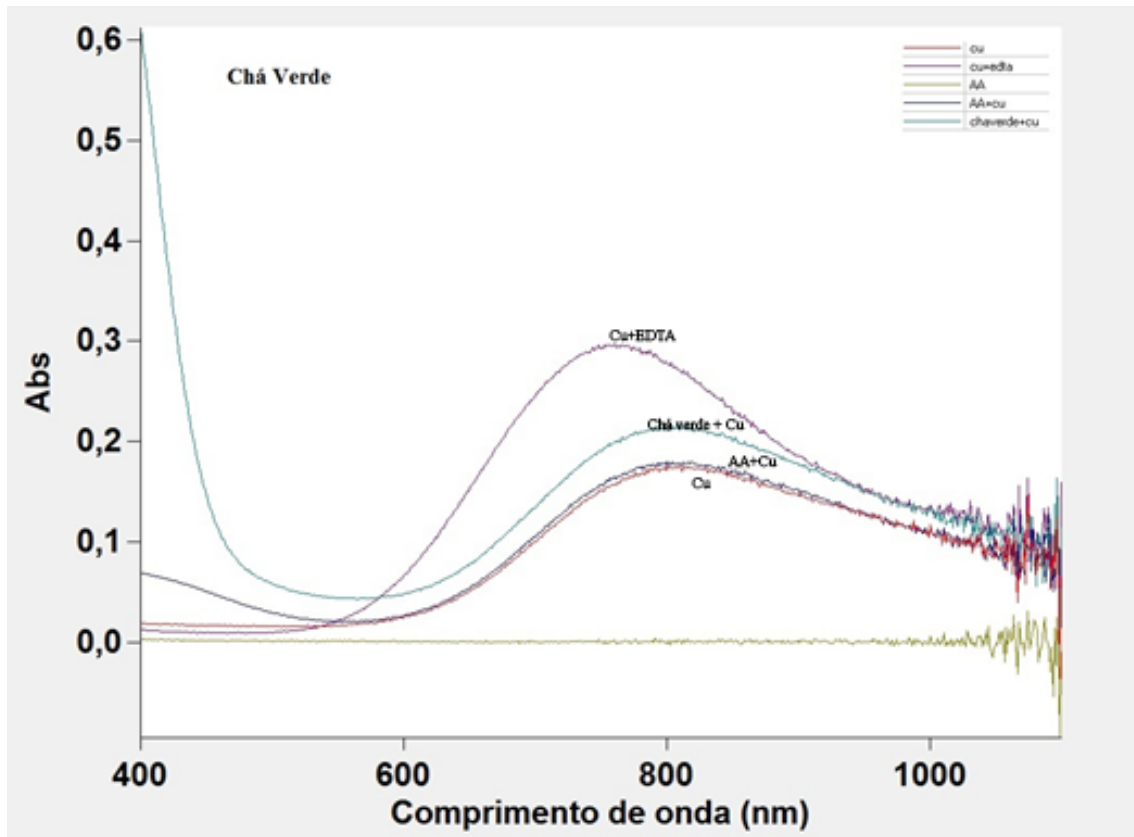
**Figura 7:** Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de pata de vaca com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico.



**Figura 8:** Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de alcachofra com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico.

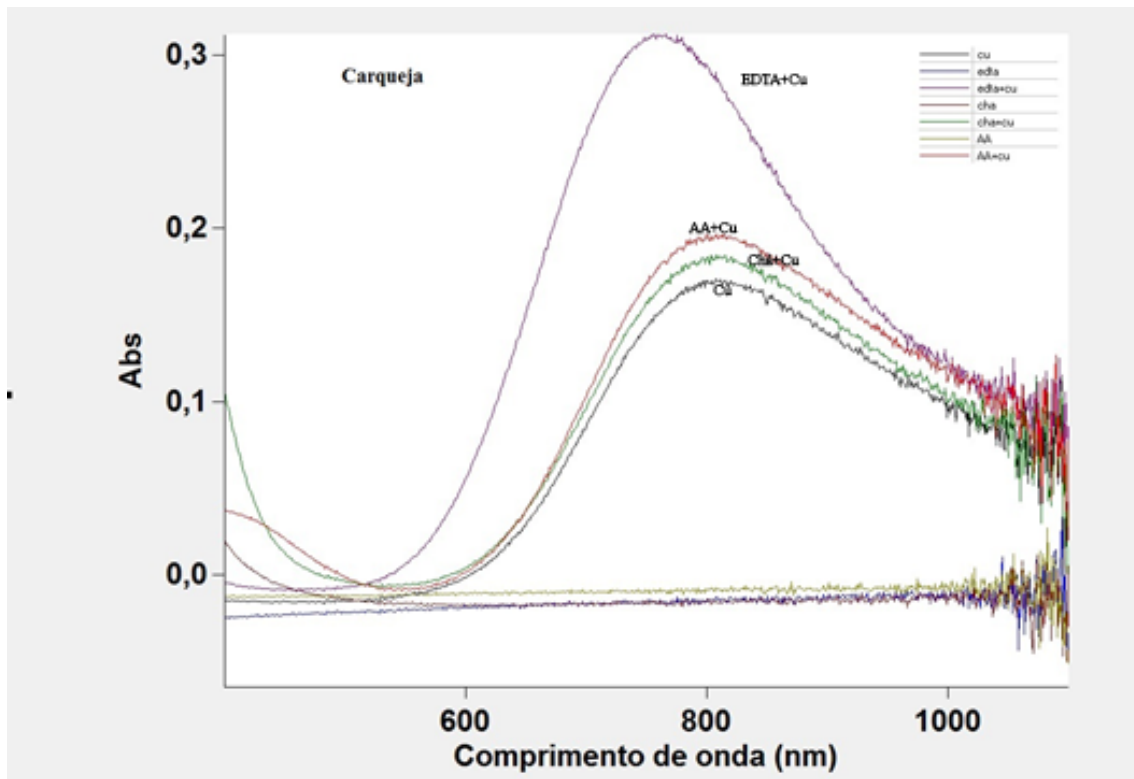


**Figura 9:** Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de chá verde com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico.





**Figura 10:** Análise em espectrofotômetro da interação da infusão de carqueja com o cobre, comparada com EDTA e ácido ascórbico.





## 5. Discussão

A enzima tirosinase desempenha um papel fundamental no processo de melanogênese, e é de total interesse a descrição das suas características, por ser uma enzima multifuncional, que se encontra amplamente distribuída na natureza [21]. Com base na atividade enzimática da tirosinase presente no suco de maçã, realizamos testes com infusões aquosas de espécies vegetais conhecidas pelo potencial medicinal, a fim de promover a inibição da atividade da tirosinase, e conseqüentemente inibir o escurecimento do suco de maçã. Das seis espécies testadas, o guaco, a carqueja, o chá verde e a pata de vaca foram eficientes na inibição do escurecimento. A inibição observada pode ser associada a compostos fenólicos presentes nessas plantas, como: os taninos, as cumarinas, os flavonóides, os alcalóides e entre outros compostos fenólicos [58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66]. A atividade antioxidante desses compostos é relacionada as propriedades redutoras de suas estruturas químicas, resultando na neutralização ou quelação de radicais livres. Os compostos formados pela ação de antioxidante fenólicos são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático presentes em sua estrutura molecular [71].

Deste modo, denominam-se antioxidantes, substâncias que presentes em baixas concentrações, retardam ou inibem significativamente a oxidação do substrato. Onde, os radicais formados não são reativos, ou são neutralizados pela ação de outro antioxidante [71]. O dano oxidativo que essas biomoléculas sofrem é relacionado a doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas. Assim, o consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos (presentes na maioria das plantas) é associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, pois inibem a formação de radicais livres [72].

Os fenóis e os polifenóis são espécies reativas de oxigênio, e suas atividades antioxidantes são associadas às suas propriedades de oxirredução, pois agem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio [72]. Entretanto, pode ocorrer deterioração desses compostos fenólicos, mediada pela ação da enzima tirosinase, que na presença de oxigênio reage com esses compostos, removendo hidrogênio de suas ramificações dando origem as quinonas, e essas podem se condensar, resultando na formação da melanina [18].

Até o momento, dentre as tirosinases já caracterizadas, a enzima extraída e isolada mais estudada é oriunda do fungo *Agaricus bisporus*, devido a semelhança estrutural com a

tirosinase dos mamíferos [21,22]. Então, com base nos resultados observados na inibição do escurecimento do suco de maçã, realizamos os testes com a enzima isolada do fungo *Agaricus bisporus*, a fim de comprovar a atividade inibitória das infusões na interação com a enzima purificada. Das seis espécies testadas, as infusões mais eficientes na inibição foram: o guaco, a carqueja, a pata de vaca e o chá verde. Assim como foi observado nos testes com o suco de maçã, a inibição pode ser associada aos compostos fenólicos presentes nessas plantas.

Em geral, a produção de altos níveis de fenóis nas plantas é relacionada ao processo de cicatrização, onde próximo a “injúria”, os fenóis são oxidados pela polifenoloxidase a quinonas e a complexos fitomelanina, que são frequentemente mais tóxicos aos invasores do que os fenóis [73]. Os taninos são considerados potentes inibidores de enzimas devido a sua complexação com proteínas enzimáticas, apesar da ação negativa do tanino no valor nutritivo de certos vegetais, em particular a redução de digestibilidade de proteínas, a inibição da ação de enzimas digestivas e interferência na absorção de ferro. [73].

Todas as tirosinases têm em comum um centro cúprico, assim os átomos de cobre presentes no centro ativo ligam-se ao oxigênio atmosférico e catalisam a reação enzimática destes às correspondentes *o*-quinonas [21, 22, 23, 24, 25]. As quinonas possuem ação antimicrobiana e seus polímeros podem atuar como taninos [26, 27]. Os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e não-hidrolisáveis, onde: os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar, os taninos não hidrolisáveis são polímeros dos flavonóides, presentes em maior quantidade nos alimentos. [73].

Baseando-se na inibição enzimática pela interação com o cobre presente no sítio ativo da enzima, dois controles foram selecionados: o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), pois possui elevada afinidade pelo metal, ligando-se ao cobre e impedindo eventos biológicos, além de impedir a formação de cupro-proteínas [57]; e o ácido ascórbico, que provoca a redução química da dopaquinona, e é utilizado como um inibidor da melanogênese devido à sua capacidade para reduzir a *o*-dopaquinona para dopa, evitando assim as formações de dopacromo e da melanina [44, 54], é um agente antioxidante utilizado com frequência para prevenir o escurecimento enzimático no processamento e armazenamento do suco de maçã, atuando na redução de *o*-quinonas a difenóis, entretanto esse pode ser completamente oxidado, e o escurecimento ocorrer pela formação de melanina. [74]. Em comparação com os controles mencionados acima, analisamos o efeito quelante das infusões

aquosas sobre o metal cobre, com base no espectro de absorvância do cobre, o qual apresenta um pico de absorvância em 800 nm quando analisado isoladamente. Considerando interação significativa quando a presença da infusão aumentava o pico de absorvância. Observamos que as infusões de guaco, chá verde, pata de vaca e alcachofra, apresentam maior interação com o metal quando comparado ao ácido ascórbico, porém menor interação quando comparado ao efeito quelante do EDTA.

Os antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia, são associados a diversos efeitos tóxicos, assim, a busca por antioxidantes naturais vem aumentando com o passar dos anos. O estudo de plantas com potencial antioxidante é de extrema importância. Tendo em vista a ampla distribuição de compostos fenólicos em plantas, e que esses apresentam atividade antioxidante natural [71, 72]. É interessante considerar que os taninos apresentam elevada ação antioxidante, e podem ser mais explorados em relação aos estudos na área de conservação de alimentos, e na ação no organismo humano. [73].

Estudos recentes demonstram que o extrato metanólico de folhas de *Camellia sinensis* (chá verde) foi capaz de inibir a atividade da enzima tirosinase, atribuindo este efeito há catequinas, que compõem os principais compostos fenólicos do extrato. Em estudos computacionais, as catequinas ligam-se à região hidrofóbica da enzima em aminoácidos localizados nas proximidades dos cobres presentes no sítio ativo, assemelhando-se a inibidores bem conhecidos [75].

## 6. Conclusões

Quanto a análise do escurecimento da maçã gala, das seis infusões utilizadas, quatro apresentaram elevado potencial inibitório, onde a inibição da PPO mostrou-se mais evidente para o chá verde e a pata de vaca, tendo em vista que em volumes menores (10%) já era possível verificar redução significativa da atividade enzimática, para o guaco e a carqueja a inibição foi associada a volumes maiores, sendo mais evidente a partir de 30%, enquanto a malva e a alcachofra, não apresentaram inibição significativa nos volumes utilizados.

Quanto a análise da cinética enzimática da tirosinase do fungo *Agaricus bisporus*, a infusão de malva e de alcachofra demonstrou baixa eficiência na inibição da tirosinase, aparentando inclusive um aumento na atividade da enzima com o aumento do volume de infusões utilizado. Para a infusão de pata de vaca foi evidente um elevado potencial de inibição, de modo que a inibição observada é significativa a partir de 10%, enquanto para as infusões de guaco, carqueja e chá verde a inibição significativa é evidente em volumes maiores, como demonstrado a 50%.

Quanto a análise da interação das infusões com o cobre presente no sítio ativo da enzima, em comparação com o efeito quelante do EDTA e do ácido ascórbico, das seis espécies vegetais utilizadas, as interações mais eficientes na atividade quelante do cobre foram as infusões de pata de vaca, chá verde e guaco, tendo em vista que a mudança no espectro do cobre em 800 nm foi maior que a observada para interação Cu/AA, porém menor que a interação do Cu/EDTA. Para a infusão de carqueja, a interação com o metal foi menor que a interação dos controles utilizados, deste modo a inibição da atividade da tirosinase deve ocorrer de outro modo, e não pelo efeito quelante do cobre. A infusão de malva não apresentou afinidade pelo cobre, tendo em vista que o espectro da interação Cu/infusão foi menor que os controles utilizados, esse resultado sugere que o mecanismo de inibição é independente da interação com o metal. Por outro lado, a infusão de alcachofra demonstrou alta afinidade pelo cobre, sendo essa, a maior interação observada dentre as espécies vegetais utilizadas no estudo, tendo em vista que essa não foi eficaz na inibição do escurecimento da maçã e nem na inibição da atividade oxidativa da tirosinase, é possível que em volumes maiores essa possa inibir a atividade da tirosinase pelo efeito quelante do cobre.

O presente trabalho colabora com a descoberta de novas espécies vegetais com elevada afinidade pelo cobre, tendo em vista a possibilidade de utilizar produtos naturais na inibição

da atividade oxidativa da tirosinase. Em suma, nossos estudos visam contribuir com a busca de alternativas naturais aos atuais conservantes utilizados na indústria.

## REFERÊNCIA

1. FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993, 1100p.
2. VILAS BOAS, E. V. B. **Qualidade de alimentos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002b, p. 59.
3. COULTATE, T.P. **Alimentos: A química de seus componentes**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 368p,
4. SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. **A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species**. Journal os Nutritional Biochemistry, v. 18, 2007, p. 567-579.
5. RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J., PAGANGA, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. Free radical Biology & Medicine, v. 20, 1996, p. 933-956.
6. BOBBIO, F. O. BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos**, 2.ed. São Paulo: Varela, 1995, 223p.
7. ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. **Polyphenol Oxidases**. In ROBISON, D. S.; ESKIN, N. A. M. (Ed.) *Oxidative Enzymes in Foods*, 1991, p. 217-273.
8. HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships**. The Journal of Nutritional Biochemistry, v. 13, 2002, p. 572-584.
9. TSAU, R. et al. **Which poliphenol compounds contribute to the total antioxidant activities of apple**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 12, 2005, p. 4989-4995.
10. LU, Y.; FOO, L. Y. **Antioxidant and radical scavengig activities of polyphenols from apple pomace**. Food Chemistry, v. 68, 2000, p. 81-85.
11. LOMMEN, A. **Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel**. Analytical Chemistry, v. 72, 2000, p. 1793-1797.
12. JEWELL, W. J.; CUMMINGS, R. J. **Apple pomace energy and solids recovery**. Journal of Food Science, v. 49, 1984, p. 407-410.



13. GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. **Phytochemicals and Targets of Chronic Disease**. In: *Phytochemicals – a new paradigm*. BIDLACK, W.R., OMAYE, S.T., MESKIN, M.S., JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998. *Chemistry*, v. 53, 2005, p. 1370-1373.
14. STRYER, L., “**Biochemistry**”, 4th Ed., Chapter 8. W. H. Freeman and Company: 181-204, 1995.
15. BRACKMANN, A. **Produção de etileno, CO<sub>2</sub> e aroma de cultivares de maçã**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.14, n.1, 1992, p.103-108.
16. HALTFIELD, S.G.S.; KNEE, M. **Effects of water loss on apples in storage**. *International Journal of Food Science and Technology*. v.23, n.6, 1988, p.575-838.
17. M. R. LOIZZO, R. TUNDIS, AND F. MENICHINI. **Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
18. VILAS BOAS, E.V. de B. **Tecnologia de processamento mínimo de banana, mamão e kiwi**. Seminário Internacional de Pós-colheita e Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2002, p. 1-7. Disponível em cd-rom.
19. MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. **Effect of modified atmosphere packaging on the quality of fresh-cut fruits**. *Stewart Postharvest*, v. 2, n. 1, fev. 2006.
20. MARSHALL, M. R.; KIM, J.; WEI, C. **Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods**. Washington: FAO, 2000.
21. ZAIDI, K. U., ALI, A. S., ALI, S. A., NAAZ, I., “**Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry**”. *Biochemistry Research International*, 2014, Article ID 854687: 16 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/854687>.
22. CHEN, X-X., SHI, Y., CHAI, W-M., FENG, H-L., ZHUANG, J-X., CHEN, Q-X., “**Condensed tannins from *Ficus virens* as tyrosinase inhibitors: structure, inhibitory activity and molecular mechanism**”. *PLoS ONE*, 2014, 9 (3): e91809: 12 pages, doi :10.1371/journal.pone.0091809.
23. CHANG, C-T., CHANG, W-L., HSU, J-C., SHIH, Y., CHOU, S-T., “**Chemical composition and tyrosinase inhibitory activity of *Cinnamomum cassia* essential oil**”. *Botanical Studies*, 54: 10-17, 2013.

24. ZHANG, H., ZHOU, Q., **“Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of saponins from Xanthoceras sorbifolia nutshell”**. PLoS ONE, 2013, 8 (8): e70090: 6 pages, doi :10.1371/journal.pone.0070090.
25. PARK, J., SUNG, N-D., **“3D-QSAR analysis and molecular docking of thiosemicarbazone analogues as a potent tyrosinase inhibitor”**. Bulletin of the Korean Chemical Society, 32 (4): 1241-1248, 2011.
26. PADMAJA, G.; BALAGOPAL, C.; POTTY, V.P. **Polifenoles yel deterioro fisiologico en yucca**. Yuca; Boletim Informativo, Cali, v.10, n.5, 1982.
27. RICKARD, J.E.; MARRIOTT, J.; GAHAN, P.B. **Oclusions in cassava xylem vessels associated with vascular discoloration**. Annals of Botany, Colchester, v.4, n.43, 1979, p.523-526.
28. SARKAR, R., ARORA, P., GARG, K. V., **“Cosmeceuticals for hiperpigmentation: what is available?”**. Journal of Cutaneous and Aesthetic surgery, 6 (1): 4-11, 2013.
29. TRIPATHI, R.K., HEARING, V.J., URABE, K. AROCA, P., SPRITZ, R.A. **Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase**. Journal of Biological Chemistry, v. 267, 1992, p.23707-12.
30. IOZUMIK, K. **Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes**. J invest Dermatol, v. 100, 1993, p. 806-11.
31. IKEHATA, K. NICELL, J.A. **Characterzation of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols**, Bioresource Technology, v. 74, 2000, p. 191-199.
32. BUSCA, G.; BERARDINELLI, S.; RESINI, C.; ARRIGHI, L. **Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recente developments**. Journal os Hazardous Materials, v. 160, 2008, p. 265-288.
33. KARGI, F.; KONYA, I. **COD, para-chlorophenol and toxicity removal from para-chlorophenol containins synthetic wastewater in na activated sludge unit**, Journal os Hazardous Materials, v. 132, I. 2-3, 2006, p. 226-231.
34. MARROT, B.; BARRIOS-MARTINEZ, A.; ROCHE, P. M. N. **Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor**, Biochemical Engineering Journal, v. 30, 2003, p. 738-742.
35. KUBO I., CHEN, Q.X., NIHEI, K. **Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors**. Food Chemistry, 81, 2003, 241-247.

36. KHANOM, F.; KAYAHARA, H.; TADASA, K. **Tyrosinase inhibitory activity of bangladeshi indigenous medicinal plants.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v.64, n.9, 2000, p. 1967-1969.
37. KUBO, I., KINST-HORI, I. **Tyrosinase inhibitors from anise oil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1998a, 1268-1271.
38. SIES, H., STAHL, W. **Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants.** *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6, 1995, p.1315-1321.
39. SIES, H. **Strategies of antioxidant defence.** Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, 1993, p.213- 219.
40. BARNETT, Y.A., KING, C.M. **An investigation of antioxidante status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans.** *Mutation Research*, Amsterdam, v.338, n.1/6, 1995, p.115-128.
41. TRABER, M.G. **Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants.** *Mineral and Electrolyte Metabolism*, Basel, v.23, n.3/6, 1997, p.135-139.
42. POMPELLA, A. **Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation.** *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, Bern, v.67, n.5, 1997, p.289-297.
43. HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. **The characterization on antioxidants.** *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.33, n.7, 1995, p.601-617.
44. CHANG, T-S., “**An update review of tyrosinase inhibitors**”. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2440-2475, 2009.
45. CHANG, T-M., “**Tyrosinase and tyrosinase inhibitors**”. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation*, 1:2, 2012.
46. CHEN, J.S.; WEI, C.; MARSHALL, M.R. **Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase.** *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1897-1901, 1991
47. CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCÍA-CARMONA, F. **Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase.** *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 1994, 982-985.
48. JONES, K.; HUGHES, J.; HONG, M.; JIA, Q.; ORNDORF, S. **Modulation of Melanogenesis by Aloesin: A Competitive Inhibitor of Tyrosinase.** *Pigment Cell Research*, v. 15, 2002, p. 335– 340.

49. NERYA, O., MUSA, R., KHATIB, S., TAMIR, S., VAYA, J. **Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers**. *Phytochemistry*, 65, 2004, 1389–139.
50. CHOWDHURY, W. K., WAHAB, M. A., KHONDKER, L., ANWAR, M.H., KHAN, M.S.I., “**Efficacy and safety of hydroquinone, kojic acid and glycolic acid combination in the treatment of melasma**”. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 11 (3): 191-196, 2012.
51. DRAELOS, Z. D., YATSKAYER, M., BHUSHAN, P., PILLAI, S., ORESAJO, C., “**Evaluation of a Kojic Acid, Emblica Extract, and Glycolic Acid Formulation Compared With Hydroquinone 4% for Skin Lightening**”. *Therapeutics for the Clinician – Cutis: Cutaneous Medicine for the Practitioner*, 86: 153-158, 2010.
52. THONGCHAI, W., LIAWRUANGRATH, B., LIAWRUANGRATH, A., “**High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts**”. *Journal of Cosmetic Science*, 58: 35-44, 2007.
53. RYCHLIŃSKA, I., NOWAK, S., “**Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC**”. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40 (2): 109-113, 2012.
54. GHEIBI, N., TAHERKHANI, N., AHMADI, A., HAGHBEEN, K., ILGHARI, D., “**Characterization of inhibitory effects of the potential therapeutic inhibitors, benzoic acid and pyridine derivatives, on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase**.” *Iranian Journal Basic Medical Sciences*, 18: 122-129, 2015.
55. KOO, J.H., RHEE, K.S., KOH, H.W., JANG, H.Y., PARK, B.H., PARK, J.W., “**Guggulsterone inhibits melanogenesis in B16 murine melanoma cells by downregulating tyrosinase expression**”. *International Journal of Molecular Medicine*, 30: 974-978, 2012.
56. CHATTERJEE, M., VASUDEVAN, B., “**Recent advances in melasma**”. *Pigment International*, 1 (2): 70-80, 2014.
57. XUEQIN DING, HUIQI XIE, Y. JAMES KANG. **The significance of copper chelators in clinical and experimental application**, *Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 301-310, 2011.
58. LARISSA FUNABASHI DE TOLEDO DIAS, ELISÂNGELA SEVERINA DE MELO, LEANDRO SANTORO HERNANDES, ELFRIEDE M. BACCHI. **Atividades antiúlcera e antioxidante Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae)**. *Revista*

- Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(1B): 309-314, Jan./Mar. 2009
59. MARIA DAS GRAÇAS LINS BRANDÃO. **Plantas medicinais e fitoterápicos**. Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas Museu de História Natural e Jardim Botânico UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
60. PAULO ERNANI RAMALHO CARVALHO engenheiro florestal, Doutor. Pesquisador da Embrapa Florestas. **Taxonomia e Nomenclatura Pata-de-Vaca**. ISSN 1517-5278, Colombo, PR Dezembro, 2003
61. KARINA LUIZE DA SILVA E VALDIR CECHINEL FILHO. **Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico**. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 3, 449-454, Curso de Farmácia, CCS, Universidade do Vale do Itajaí, 88302-202 Itajaí – SC, 2002
62. JUSSARA NIEHUES PINHEIRO, JEVERSON MOREIRA, ANGELA ERNA ROSSATO. ***Camellia sinensis* (L.) Kuntze (cha-verde) e seus aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. *Infarma*, v.22, nº 1/4, 2010
63. BOTSARIS, A. S; ALVES, L. F. ***Cynara scolymus* L. (Alcachofra)**. Instituto Brasileiro de Plantas Mediciniais, IBPM, Rua General Urquiza 128, Leblon, 22431-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Revista Fitos* Vol.3 Nº02 junho 2007
64. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Mikania glomerata* (GUACO)**. Organização: Ministério da Saúde e Anvisa Fonte do Recurso: Ação 20K5 (DAF/SCTIE/MS) 2012.
65. CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L., **Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker**. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.14, n.2, 2012, p.400-409.
66. SRI RANJANI SIVAPALAN, **Phytochemical study on medicinal plant – *Sida cordifolia* Linn**, *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 2(1): 216-220, 2015
67. NAROUANI, **Both aluminum and polyphenols in green tea decoction (*Camellia sinensis*) affect iron status and hematological parameters in rats**, *Eur J Nutr* (2007) 46:453–459
68. KLIMCZAK E SWIGLO, 2015 **Green tea extract as na anti-browning agent for cloudy apple juice**. *JSciFoodAgric*2017;97:1420–142

69. RAQUEL DA SILVA TEIXEIRA, PAULA RAFAELA ROCHA, HUDSON CAETANO POLONINI, MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO, MARIA DAS GRAÇAS AFONSO MIRANDA CHAVES, NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO, **Mushroom tyrosinase inhibitory activity and major fatty acid constituents of Amazonian native flora oils.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 48, n. 3, jul./sep., 2012.
70. PEREIRA, F. K. P.; FACCIO, M. T.; SANTO, J. A. M; ALMEIDA, C. L. A.; ARAÚJO, M. L. M; SILVA, R. O; ARAUJO, F. T. S. **Construção de curva de calibração por padrão externo para determinação de teor de cobre em água potável da cidade Brejo do Cruz – Paraíba por Espectrofotometria de Absorção Molecular.** In: 5º Congresso Norte-Nordeste de Química. Natal – RN – UFRN, 2013.
71. CLEYTON MARCOS DE M. SOUSA, HILRIS ROCHA E SILVA, GERARDO MAGELA VIEIRA-JR., MARIANE CRUZ C. AYRES, CHARLLYTON LUIS S. DA COSTA, DELTON SÉRVULO ARAÚJO, LUIS CARLOS D. CAVALCANTE, ELCIO DANIEL S. BARROS, PAULO BREITNER DE M. ARAÚJO, MARCELA S. BRANDÃO E MARIANA H. CHAVES. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** *Quim. Nova*, vol. 30, no. 2, 351-355, 2007
72. SELENE MAIA DE MORAIS. **Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil.** Article in Revista Brasileira de Farmacognosia · March 2009
73. MARA REIS SILVA, MARIA APARECIDA AZEVEDO PEREIRA DA SILVA. **Aspectos nutricionais de fitatos e taninos.** *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(1): 5-19, jan./abr., 1999
74. ROS JR, RODRIGUEZ-LÓPEZ JN AND GARCIA-CÁNOVAS F, **Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase.** *Biochem J* 295:309–312 (1993).
75. SURACHED THITIMUTA, PIMOLPAN PITHAYANUKUL, SARUTH NITHITANAKOOL, RAPEPOL BAVOVADA, JIRAPORN LEANPOLCHAREANCHAI AND PATCHREENART SAPARPAKORN, ***Camellia sinensis* L. Extract and Its Potential Beneficial Effects in Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Hepatotoxic, and Anti-Tyrosinase Activities.** *Molecules* 2017, 22, 401; doi:10.3390/molecules22030401