



LÍVIA ROSAS FERREIRA

**ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DA TANASE
DE *Paecilomyces variotii* E SUA APLICAÇÃO NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DOS POLIFENÓIS DO
SUCO DE LARANJA**

**CAMPINAS
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LÍVIA ROSAS FERREIRA

**ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DA TANASE DE
Paecilomyces variotii E SUA APLICAÇÃO NA
BIOTRANSFORMAÇÃO DOS POLIFENÓIS DO SUCO DE
LARANJA**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRA EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LÍVIA ROSAS FERREIRA
E ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a GABRIELA ALVES MACEDO.

Assinatura do orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

F413e Ferreira, Livia Rosas, 1985-
Estudo da especificidade da tanase de Paecilomyces variotii e sua aplicação na biotransformação dos polifenóis do suco de laranja / Livia Rosas Ferreira. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Tanase. 2. Biotransformação. 3. Flavonoides. 4. Suco de laranja. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Tannase specificity studies and its application in biotransformation of orange juice polyphenols

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Tannase

Biotransformation

Flavonoids

Orange juice

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Marcelo Lima Ribeiro

Mário Roberto Maróstica Junior

Data da defesa: 24/08/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

PROF.^a DR.^a GABRIELA ALVES MACEDO
ORIENTADORA

PROF. DR. MARCELO LIMA RIBEIRO
USF/BRAGANÇA PAULISTA
(MEMBRO TITULAR)

PROF. DR. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR
FEA/UNICAMP
(MEMBRO TITULAR)

PROF.^a DR.^a HELIA HARUMI SATO
FEA/UNICAMP
(MEMBRO SUPLENTE)

PROF.^a DR.^a PATRÍCIA DE OLIVEIRA CARVALHO
USF/BRAGANÇA PAULISTA
(MEMBRO SUPLENTE)

Dedico este trabalho aos meus pais, Osmar e Luciana, pelo constante incentivo aos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo pela orientação, dedicação e apoio durante a realização deste trabalho e a Prof.^a Dr.^a Juliana Alves Macedo pelos ensinamentos, dedicação e compreensão. Meu respeito e admiração.

Aos meus colegas do laboratório de bioquímica, André, Bia, Camilo, Cecilia, Dani Branta, Erica, Evandro, Fabiano, Fabiola, Fernanda, Giulia, Haroldo, Isa, Joelise, José Valdo, Leonardo, Livia Dias, Marcela, Márcio, Mel, Paulinha, Paty Schons, Pri Becker, Pri Hoffmann, Ricardo, Roberta, Ruann, Thiago, Val, Vivi e as iniciações Fernanda e Natalia, pelos momentos de descontração, aprendizado e suporte nas atividades do laboratório.

Ao Dr. Gustavo Braga Sanvido, do laboratório ThoMSon do Instituto de Química da UNICAMP, pelo auxílio prestado com as análises de espectrometria de massas.

A Prof.^a Dr.^a Patrícia de Oliveira Carvalho, da Universidade São Francisco, por disponibilizar os padrões das flavanonas hesperidina e hesperetina.

A Prof.^a Dr.^a Glaucia Maria Pastore pela disponibilidade do uso do fluorímetro e aos alunos e técnicos do laboratório de Bioaromas pelo auxílio e companhia agradável.

Aos professores da FEA/UNICAMP que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, em especial, a Prof.^a Dr.^a Helia Harumi Sato, pelo carinho e ajuda.

A todos os funcionários da FEA/UNICAMP, em especial, Cosme, Marcos Sampaio, Marcos A. Castro, Guiomar e Jardette, pela atenção, paciência e auxílios prestados.

A banca examinadora pela contribuição dada ao trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A meu pai, Osmar, minha mãe Luciana e minha irmã Laís pelo suporte emocional e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

A todos os meus familiares pelo carinho.

Ao Bruno Muniz pelo apoio e compreensão.

A Luciana Malta, Danielle Godinho e Carolina Toledo pela amizade, solidariedade e companhia durante minha temporada em Campinas.

Ao casal Franciele e Gustavo Molina pelo apoio e amizade de longa data.

A Nossa Senhora Desatadora dos Nós pelos milagres diários.

A Deus por colocar todos no meu caminho.

“Que seu remédio seja seu alimento, e que
seu alimento seja seu remédio.”

Hipócrates (460 a.c - 377 a.c)

RESUMO

A tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20), conhecida como tanase, é uma enzima com habilidade de atuar em ligações éster e depsídicas de taninos hidrolisáveis e também foi descrita como capaz de hidrolisar polifenóis como ácido clorogênico, epicatequina galato e epigallocatequina galato. Os polifenóis, ou compostos fenólicos, estão distribuídos em uma ampla variedade de fontes vegetais e estão relacionados à prevenção de câncer e doenças cardiovasculares. No entanto, os polifenóis ocorrem frequentemente como glicosídeos ou outros conjugados, o que pode comprometer a biodisponibilidade e os efeitos benéficos destes compostos à saúde, sendo necessária a biotransformação destes conjugados no trato gastrointestinal. Como alternativa tecnológica, a biotransformação enzimática dos polifenóis ou de suas fontes vegetais também pode liberar estes compostos de seus conjugados e consequentemente, melhorar a atividade funcional de tais antioxidantes. O objetivo do presente trabalho foi estudar a especificidade do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* frente a diferentes padrões comerciais de polifenóis e avaliar sua atuação na matriz alimentar suco de laranja quanto a modificações em características físico-químicas, perfil fenólico e atividade antioxidante. O estudo da especificidade do extrato semipurificado de tanase foi realizado por CLAE-DAD e ESI-MS e o suco de laranja foi avaliado quanto aos parâmetros acidez total titulável, sólidos totais, pH, teor de vitamina C e fenólicos totais. As alterações no perfil fenólico do suco de laranja foram avaliadas por CLAE-DAD e a atividade antioxidante pelos métodos *in vitro* ORAC e de sequestro de radicais DPPH. Os resultados obtidos por CLAE-DAD e ESI-MS mostraram que não houve hidrólise dos padrões ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido elágico, resveratrol, quercetina e hesperetina pelo extrato semipurificado de tanase nas condições empregadas para o teste. No entanto, foi observado a hidrólise da ligação entre a aglicona e o dissacarídeo dos flavonoides rutina, naringina e hesperidina, gerando respectivamente os produtos quercetina, naringenina e hesperetina, e indicando uma atividade diglicosídica do extrato semipurificado de tanase. Para o suco de laranja, os resultados de acidez titulável, pH, sólidos solúveis e vitamina C não apresentaram diferença significativa após o tratamento enzimático do suco com extrato semipurificado de tanase, no entanto, houve um aumento de 16,8% no teor de fenólicos totais. Além disso, foi verificada uma modificação no perfil polifenólico do suco de laranja obtido por CLAE-DAD, resultando em um aumento na atividade antioxidante do suco biotransformado em aproximadamente 50% pelo método ORAC e 70% pelo método DPPH. Os padrões comerciais hesperidina e naringina biotransformados pelo extrato semipurificado de tanase também apresentaram maior atividade antioxidante do que o controle sem reação. Pelo que se tem conhecimento, a hidrólise de flavonoides glicosilados por tanase é um relato inédito na literatura e, portanto este trabalho fornece novos substratos para o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e confirma que a biotransformação é uma boa estratégia para melhorar a atividade antioxidante *in vitro* de polifenóis e de suco de laranja.

Palavras-chave: Tanase, biotransformação, flavonoides, suco de laranja.

ABSTRACT

Tannin acyl hydrolases (EC 3.1.1.20), commonly named as tannases, are enzymes able to act on ester and depside bonds of hydrolysable tannins and have also been described to hydrolyse polyphenols such as chlorogenic acid, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate. Polyphenols, or phenolic compounds, are widely distributed in the plant kingdom and are related to the prevention of cancer and cardiovascular diseases. However, polyphenols are often found as glycosides or other conjugates, which may affect their bioavailability and health benefits, being necessary the biotransformation of these compounds in the gastrointestinal tract. As a technological alternative, the enzymatic biotransformation of the polyphenols or their plant sources can also release these compounds from their conjugates and therefore improve the functional activity of these antioxidants. The objectives of the present study were to investigate the specificity of the crude extract of tannase from *Paecilomyces variotii* in reaction with different commercial standards of phenolic compounds and to evaluate the effects on the physico-chemical properties, phenolic profile and antioxidant activity of the orange juice reacted with the crude extract of tannase. The specificity study of the crude extract of tannase was performed by HPLC-DAD and ESI-MS. The orange juice was subject to analysis of titratable acidity, pH, and total solids, vitamin C and total phenolics contents. Furthermore, changes in the phenolic profile of orange juice were analyzed by HPLC-DAD and the antioxidant capacity of the samples was tested by *in vitro* DPPH and ORAC assays. The results obtained by HPLC-DAD and ESI-MS did not show hydrolysis of the standards chlorogenic acid, ferulic acid, ellagic acid, resveratrol, quercetin and hesperetin at test conditions. However, the crude extract of tannase was able to hydrolyse the glucosidic bond between disaccharide and aglycone of the flavonoids rutin, hesperidin and naringin, yielding as products quercetin, hesperetin and naringenin, respectively, and indicating a diglycosidase activity of the crude extract of tannase. For orange juice, the results of acidity, pH, soluble solids and vitamin C showed no significant difference after enzymatic treatment with the crude extract of tannase, but there was an increase of 16.8% in total phenolic content. In addition, there was an extensive modification in the polyphenolic profile from the biotransformed orange juice obtained by HPLC-DAD, which resulted about 50% and 70% increase in orange juice antioxidant activity by ORAC and DPPH methods, respectively. The standards hesperidin and naringin biotransformed by crude extract of tannase also showed higher antioxidant activities than the control. To the best of our knowledge, this is the first report about tannase which could hydrolyze flavonoid glycosides and, therefore this work provides new substrates for crude extract of tannase from *P. variotii* and confirms that biotransformation is a good strategy to improve *in vitro* antioxidant activity of polyphenols and orange juice.

Keywords: Tannase, biotransformation, flavonoids, orange juice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Biotransformação de epigallocatequina galato por tanase de *Paecilomyces variotii*.....9
- Figura 2:** Hidrólise da rutina pela enzima rutinase formando quercetina.12
- Figura 3:** Transformação enzimática de glicosil-isoflavonas a agliconas.....17

CAPÍTULO II

- Figura 1:** Classificação e exemplos de polifenóis (destaque para os compostos deste estudo).....32
- Figura 2:** Classificação e exemplos de flavonoides (destaque para os flavonoides deste estudo).....35
- Figura 3:** Estruturas representativas dos taninos.....37
- Figura 4:** Atividades esterásicas e depsídicas da tanase.....38
- Figura 5:** Mecanismo de ação da tanase.....40
- Figura 6:** Hidrólise de elagitaninos produzindo ácido hexahidroxidifênico espontaneamente lactonizado para ácido elágico.50
- Figura 7:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação do ácido elágico com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.51
- Figura 8:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do ácido clorogênico com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.52
- Figura 9:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do ácido ferúlico com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.54

Figura 10: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do resveratrol com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.	55
Figura 11: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação da quercetina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.	57
Figura 12: Estrutura química da quercetina (representada com a denominação dos anéis) e dos produtos de sua hidrólise alcalina, floroglucina e ácido protocatecólico.....	57
Figura 13: Hidrólise da quercetina por uma quercetinase produzindo monóxido de carbono (CO) e um depsídeo.	58
Figura 14: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação da rutina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando a formação de quercetina como produto da reação com o decorrer do tempo.	59
Figura 15: Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 260 nm da reação da rutina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos com (A) destaque para o espectro de absorção da rutina e (B) destaque para o espectro de absorção do produto da reação.	60
Figura 16: Espectro de massas da reação a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos de (A) rutina, (B) rutina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> e (C) quercetina, indicando a formação de quercetina como produto da reação do extrato semipurificado de tanase de <i>P. variotii</i> com rutina.	61
Figura 17: Via hidrolítica da rutina a quercetina por duas enzimas (α -ramnosidase e β -glicosidase) através da isoquercitrina e por uma única enzima, a β -rutosidase.	62
Figura 18: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> em rutina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.	63
Figura 19: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da hesperetina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.	64
Figura 20: Estrutura química da hesperetina (representada com a denominação dos anéis) e dos produtos de sua hidrólise alcalina, floroglucina e ácido isoferúlico.	65

Figura 21: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da hesperidina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando a formação de hesperetina como produto da reação com o decorrer do tempo.....	66
Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 280 nm da reação de hesperidina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos com (A) destaque para o espectro de absorção da hesperidina e (B) destaque para o espectro de absorção do produto da reação.	67
Figura 23: Espectro de massas da reação a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos de (A) hesperidina, (B) hesperidina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> e (C) hesperetina, indicando a formação de hesperetina como produto da reação do extrato semipurificado de tanase de <i>P. variotii</i> com hesperidina.	68
Figura 24: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> em hesperidina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.	70
Figura 25: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da naringina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando a formação de um produto da reação com o decorrer do tempo.	70
Figura 26: Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 280 nm da reação de naringina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos com (A) destaque para o espectro de absorção da naringina e (B) destaque para o espectro de absorção do produto da reação.	71
Figura 27: Espectro de massas da reação a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos de (A) naringina e (B) naringina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> , indicando a formação de naringenina como produto da reação.	73
Figura 28: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> em naringina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.	74

CAPÍTULO III

Figura 1: Estrutura geral e padrão de numeração dos flavonoides.	90
Figura 2: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação da hesperidina a 40°C em pH 7,4 durante 30 minutos (A) sem tanase e (B) com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> indicando a formação de hesperetina como produto da reação.....	110

Figura 3: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de 30 minutos a 40°C em pH 7,4 (A) da hesperidina com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> , com destaque para o espectro de absorção do produto da reação e (B) do padrão de hesperetina com extrato semipurificado de tanase de <i>P. variotii</i>	111
Figura 4: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação da naringina a 40°C em pH 7,4 durante 30 minutos (A) sem tanase e (B) com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> indicando a formação de um produto da reação.	112
Figura 5: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação a 40°C da (A) naringina em pH 7,4 com extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> e (B) naringina em pH 4,0 com naringinase comercial de <i>Penicillium decumbens</i> , com destaque para os espectros de absorção dos produtos das reações.	113
Figura 6: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> nas flavanonas hesperidina e naringina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.	114
Figura 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação a 40°C da (A) amostra de suco de laranja em pH 7,4, (B) da amostra de suco de laranja em pH 7,4, com o extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> e (C) da amostra de suco de laranja em pH 4,0 tratado com a naringinase comercial de <i>Penicillium decumbens</i>	122

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Estudos de biotransformação de polifenóis em bebidas utilizando diferentes enzimas.	8
Tabela 2: Estudos de biotransformação de polifenóis em cereais com diferentes micro-organismos e enzimas.	13
Tabela 3: Estudos de biotransformação de polifenóis em produtos de soja com diferentes micro-organismos.	16
Tabela 4: Estudos de biotransformação de polifenóis de resíduos agro-industriais com diferentes micro-organismos.	20

CAPÍTULO II

Tabela 1: Presença de flavonoides em alimentos.	36
Tabela 2: Exemplos de fungos utilizados para a produção de tanase e condições ótimas de inoculação.	39
Tabela 3: Medida da atividade enzimática específica de tanase do extrato enzimático semipurificado de <i>Paecilomyces variotii</i>	48

CAPÍTULO III

Tabela 1: Características estruturais dos principais flavonoides presentes em frutos cítricos na forma de agliconas e glicosídeos.	91
Tabela 2: Medida da atividade enzimática específica do extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> e de naringinase comercial obtida de <i>Penicillium decumbens</i>	108
Tabela 3: Equivalentes em Trolox e faixa de linearidade dos resultados pelo método ORAC e equivalentes em Trolox pelo método de sequestro de radicais DPPH realizados para os polifenóis hesperidina e naringina controle e biotransformado.	115
Tabela 4: Caracterização do suco de laranja** controle e biotransformado.	118
Tabela 5: Teor de fenólicos totais do suco de laranja** controle e biotransformado.	120

Tabela 6:	Equivalentes em Trolox e faixa de linearidade dos resultados pelo método ORAC e equivalentes em Trolox pelo o método de sequestro de radicais DPPH realizados para os sucos de laranja* controle e biotransformado.....	124
------------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AUC	Área sob a curva de decaimento da fluorescência
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	Enzyme Commission Numbers
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
ET	Ensaio baseado na reação de transferência de elétrons
EUA	Estados Unidos da América
Fe	Ferro
FEA	Faculdade de Engenharia de Alimentos
FRAP	Potencial redutor do íon férrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAT	Ensaio baseado na transferência de um átomo de hidrogênio
HPLC	High performance liquid chromatography
m/z	Relação massa/carga
NBR	Norma brasileira
NH	Neohesperidosídeo
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio

PDA	Potato dextrose agar (ágar batata)
p-NP	p-nitrofenol
p-NPG	p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
Rut	Rutinosídeo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
Trolox®	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	3

CAPÍTULO I

ESTRATÉGIAS DE BIOPROCESSAMENTO PARA O AUMENTO DA BIOACESSIBILIDADE DE POLIFENÓIS EM ALIMENTOS E BEBIDAS

RESUMO.....	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO	7
2.1.1 Bebidas.....	8
2.1.2 Cereais	12
2.1.3 Derivados de soja e outras leguminosas	15
2.1.4 Resíduos agro-industriais.....	20
3 CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

CAPÍTULO II

ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DA TANASE DE *PAECILOMYCES VARIOTII* FRENTE A DIFERENTES POLIFENÓIS

RESUMO.....	29
1 INTRODUÇÃO	30
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	31
2.2 TANINO ACIL HIDROLASE.....	38

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO SEMIPURIFICADO DE TANASE.	42
3.1.1 Produção e pré-purificação	42
3.1.2 Determinação de atividade enzimática	43
3.2 ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DO EXTRATO SEMIPURIFICADO DE TANASE	44
3.2.1 Substratos.....	44
3.2.2 Reação enzimática	45
3.2.3 Avaliação da reação enzimática.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 ÁCIDOS FENÓLICOS.....	49
4.2 ESTILBENOS.....	54
4.3 FLAVONOIDES.....	56
4.3.1 Flavonóis.....	56
4.3.2 Flavanonas	64
5 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

CAPÍTULO III

INCREMENTO DA BIOATIVIDADE DE POLIFENÓIS DO SUCO DE LARANJA POR AÇÃO DA TANASE DE *PAECILOMYCES VARIOTII*

RESUMO.....	87
1 INTRODUÇÃO	88
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	89
2.1 SUCO DE LARANJA	89
2.2 FLAVONOIDES EM FRUTOS CÍTRICOS	89
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES.....	92
2.4 BIODISPONIBILIDADE DE FLAVONOIDES	94
2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES	96
2.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	97

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
3.1 PRODUÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DE TANASE	99
3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	100
3.2.1 Tanase	100
3.2.2 Naringinase	101
3.3 BIOTRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA	102
3.3.1 Polifenóis	102
3.3.2 Suco de laranja.....	102
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA	103
3.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO.....	104
3.5.1 Teor de fenólicos totais no suco de laranja.....	104
3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	105
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	105
3.6.1 Método do radical livre DPPH.....	106
3.6.2 Capacidade de absorção do radical oxigênio	106
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	107
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
4.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DOS POLIFENÓIS	108
4.1.1 Avaliação do perfil fenólico	109
4.1.2 Atividade antioxidante	115
4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DO SUCO DE LARANJA	118
4.2.1 Caracterização do suco de laranja.....	118
4.2.2 Avaliação do perfil fenólico	119
4.2.3 Atividade antioxidante	123
5 CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
 CONCLUSÃO GERAL	 135
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	136
ANEXOS - CAPÍTULO II.....	137
ANEXOS - CAPÍTULO III	151

INTRODUÇÃO GERAL

O interesse dos consumidores e fabricantes de alimentos por fontes de polifenóis tem aumentado por várias razões. Estudos epidemiológicos sugerem associação entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em polifenóis e a prevenção de doenças e, além disso, estes compostos podem ser utilizados em alimentos contra a oxidação (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Eles são considerados os antioxidantes mais abundantes em nossa dieta, entretanto, a estrutura química desses compostos pode afetar sua biodisponibilidade e propriedades antioxidantes (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Os polifenóis estão presentes em uma ampla variedade de plantas frequentemente encontrados como glicosídeos, ésteres de ácido quínico, chiquímico ou tartárico ou polímeros (MANACH et al., 2004). Os polifenóis na forma glicosilada são mais solúveis em água, entretanto são menos reativos contra os radicais livres, pois a ligação com o grupo glicosídeo indisponibiliza grupos hidroxilo dos anéis fenólicos importantes para a estabilidade desses radicais (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1997; VATTEM; SHETTY, 2003). Os compostos fenólicos não ligados a glicosídeos, denominados agliconas, podem ser diretamente absorvidos pelo intestino delgado, no entanto, a absorção dos polifenóis na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros requer hidrólise preliminar por enzimas intestinais ou pela microbiota do cólon. Mesmo assim, a eficiência de absorção dos compostos fenólicos no cólon ainda pode ser reduzida porque, durante o processo, a microbiota também pode degradar as agliconas em vários ácidos aromáticos simples (MANACH et al., 2004).

Considerando a variedade no teor de antioxidantes fenólicos nos alimentos, juntamente com a baixa biodisponibilidade natural desses compostos, estratégias a fim de enriquecer os alimentos com polifenóis biodisponíveis podem trazer melhores benefícios à saúde. Uma alternativa é o bioprocessamento de fontes vegetais e seus produtos, como a fermentação ou a hidrólise enzimática desses alimentos (VATTEM; GHAENDIAN; SHETTY, 2005).

A tanase é uma enzima capaz de atuar em ligações éster e depsídica em substratos como ácido tânico e ainda, em ácido clorogênico, epicatequina galato e epigallocatequina galato (LEKHA; LONSANE, 1997). Battestin, Macedo e Freitas (2008) estudaram a capacidade da tanase de *Paecilomyces variotii* em hidrolisar epigallocatequina galato de chá verde em epigallocatequina e ácido gálico e constataram maior atividade antioxidante após a hidrólise enzimática. No entanto, segundo García-Conesa et al. (2001), a tanase pode ter ação em outros compostos fenólicos presentes em fontes vegetais.

Assim, os objetivos principais do presente trabalho foram estudar a especificidade enzimática do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* frente a diferentes polifenóis purificados e avaliar a atuação do extrato de tanase na matriz alimentar suco de laranja. Para isso, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* foi produzido e caracterizado quanto a sua atividade enzimática específica e teve sua especificidade avaliada frente a diferentes padrões de polifenóis por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas. O suco de laranja também sofreu reação com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e foi avaliado quanto às alterações nos parâmetros acidez titulável, pH, teor de sólidos solúveis, teor de vitamina C, fenólicos totais, perfil fenólico por CLAE e atividade antioxidante pelos métodos *in vitro* de sequestro dos radicais DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).

O presente trabalho será apresentado na forma de artigos científicos e dividido em três capítulos. O primeiro capítulo consiste de uma revisão bibliográfica contemplando alguns estudos que utilizaram técnicas de bioprocessamento a fim de biotransformar e aumentar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos em alimentos e bebidas. Com o objetivo de caracterizar um potencial biocatalisador para reações de biotransformação, o segundo capítulo apresenta um estudo da especificidade enzimática do extrato semipurificado de tanase obtida do micro-organismo *P. variotii* frente a diferentes substratos polifenólicos puros. Por fim, o terceiro capítulo consiste na aplicação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* na biotransformação dos polifenóis de suco de laranja concentrado e na avaliação de alterações nas propriedades físico-químicas e antioxidantes do suco em decorrência da biotransformação.

REFERÊNCIAS*

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. de. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 228-233, 2008.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.

GARCÍA-CONESA, M.T. et al. Hydrolysis of diethyl diferulates by tannase from *Aspergillus oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 319-324, 2001.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; NICHOLAS, J.M.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 367-379, 2003.

VATTEM, D.A.; GHAENDIAN, R.; SHETTY, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 14, n. 2, p. 120-130, 2005.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CAPÍTULO I

ESTRATÉGIAS DE BIOPROCESSAMENTO PARA O AUMENTO DA BIOACESSIBILIDADE DE POLIFENÓIS EM ALIMENTOS E BEBIDAS*

RESUMO

Os polifenóis são encontrados em uma ampla variedade de fontes vegetais, incluindo frutas, legumes e cereais e em bebidas como chá e suco de frutas. Estes compostos exibem efeitos benéficos para a saúde como consequência de suas propriedades antioxidantes. No entanto, os polifenóis naturais ocorrem frequentemente como glicosídeos, polímeros ou ésteres de ácido quínico, chiquímico ou tartárico o que pode afetar a biodisponibilidade e capacidade antioxidante destes compostos. Por estas razões, a biotransformação no trato gastrointestinal desempenha um papel essencial na biodisponibilidade dos polifenóis. Como uma alternativa tecnológica, bioprocessos como fermentação e hidrólise enzimática dos polifenóis ou de suas fontes vegetais são meios potenciais de aumentar a atividade funcional de tais antioxidantes por meio do aumento da concentração de compostos fenólicos livres a partir de seus glicosídeos ou outros conjugados. Esta revisão bibliográfica aborda estratégias de bioprocessamento para a biotransformação e o aumento da bioacessibilidade de polifenóis em alimentos e bebidas e ainda apresenta áreas de pesquisa que exigem um estudo mais aprofundado.

Palavras-chave: Biotransformação, polifenóis, alimentos, bebidas, enzimas.

* FERREIRA, L.R.; MACEDO, J.A.; MACEDO, G.A. Recent progress in bioprocessing techniques to improve bioaccessibility of polyphenols in food. In: SUN, J. (ed.). **Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources and Health Benefits**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2012. In press.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e vegetais está geralmente associado à redução do risco de desenvolvimento de câncer e doenças cardiovasculares, sendo estes efeitos protetores atribuídos principalmente aos carotenoides, ao ácido ascórbico e aos polifenóis (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Compostos fenólicos ou polifenóis são definidos quimicamente como substâncias com um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxilas ou derivados funcionais (ésteres, éteres de metila, glicosídeos, dentre outros) (ESCARPA; GONZALES, 2001). Eles são considerados os antioxidantes mais abundantes na dieta humana, entretanto, a estrutura química desses compostos pode afetar suas propriedades biológicas como biodisponibilidade, atividade antioxidante e interações específicas com receptores celulares e enzimas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

A biodisponibilidade de um dado composto ou de seu metabólito depende de fatores, como a complexidade da matriz, a estrutura química do composto de interesse e o tempo de trânsito intestinal (HOLST; WILLIAMSON, 2008). Assim, os polifenóis mais abundantes na dieta humana não são necessariamente os mais ativos, pois eles podem possuir menor atividade intrínseca, serem pouco absorvidos no intestino, altamente metabolizados ou ainda, rapidamente eliminados. Além disso, o teor de polifenóis das plantas pode diferir entre as variedades de espécies e também com a maturação na época da colheita, fatores ambientais, processamento e armazenamento (MANACH et al., 2004).

Os polifenóis, em especial aqueles encontrados na forma de ésteres, glicosídeos e polímeros, nem sempre estão prontamente biodisponíveis sendo necessária a biotransformação destes compostos no trato gastrointestinal (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Como alternativa, bioprocessos, como fermentação ou hidrólise enzimática de fontes vegetais e seus produtos, podem liberar os compostos fenólicos dos seus conjugados e consequentemente, melhorar a atividade funcional dos alimentos (GEORGETTI et al., 2009). Esta revisão irá abordar algumas técnicas de bioprocessamento empregadas com o objetivo de melhorar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos em alimentos e bebidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO

O termo biotransformação é aplicado a uma modificação específica de um determinado composto para um produto com estrutura semelhante ao composto original, realizada por células ou enzimas isoladas em um processo de apenas uma ou duas etapas de reação. Na fermentação, diferentemente do observado na biotransformação, o substrato é convertido em um produto por meio de uma via metabólica celular complexa, e o produto obtido muitas vezes não tem qualquer semelhança estrutural com o substrato (CASTRO; ANDERSON, 1995; COLLINS; KENNEDY, 1999).

A aplicação da biotransformação na procura por novos compostos é ainda modesta considerando a grande disponibilidade de micro-organismos e o amplo espectro de reações que eles podem atuar (BORGES et al., 2009). Além disso, a reação geralmente é realizada em condições amenas de temperatura, pressão e pH, e em decorrência da especificidade ao substrato, a biotransformação pode simplificar processos de fabricação eliminando várias etapas de reações químicas (COLLINS; KENNEDY, 1999; PETERSEN; KIERNER, 1999). Assim, a biotransformação pode ser considerada uma técnica econômica e ecologicamente competitiva, mas ainda é limitada pela disponibilidade de enzimas e substratos e pela estabilidade operacional do processo, fatores esses que podem ser superados pelo desenvolvimento científico (BORGES et al., 2009).

Os polifenóis são substâncias com um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxilas ou derivados funcionais e estão divididos em diversas classes de acordo com o número de anéis aromáticos presentes na estrutura química e com os elementos estruturais que ligam estes anéis entre si, sendo as principais classes os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas e taninos (D'ARCHIVIO et al., 2007; ESCARPA; GONZALES, 2001; IGNAT; VOLFF; POPA, 2009; MANACH et al., 2004). Nos últimos anos, vêm sendo estudados métodos destinados a melhorar a bioacessibilidade de compostos fenólicos em alimentos. A seguir é apresentada uma visão

geral das atuais aplicações de fermentação e/ou tratamentos enzimáticos em alimentos e bebidas para esse objetivo.

2.1.1 Bebidas

As bebidas são as principais fontes de polifenóis na dieta humana, com destaque para o vinho tinto, chá, café e sucos (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). O chá é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo (KHAN; MUKHTAR, 2007). As formas predominantes de polifenóis em folhas de chá fresco, conhecidas como catequinas, são epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina (EGC) e epigallocatequina galato (EGCG) (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997). A EGCG, encontrada principalmente no chá verde, é considerada um dos polifenóis mais eficazes na prevenção de câncer (KHAN; MUKHTAR, 2007). A Tabela 1 apresenta alguns estudos de biotransformação de polifenóis em bebidas utilizando diferentes enzimas.

Tabela 1: Estudos de biotransformação de polifenóis em bebidas utilizando diferentes enzimas.

Referência	Substrato	Enzima
Battestin, Macedo e Freitas (2008)	Padrão de EGCG e extrato de chá verde	Tanase
Macedo et al. (2011)	Padrões de EGCG e ácido clorogênico e extratos de chá mate e chá verde	Tanase
Rivelli et al. (2011)	Padrão de ácido clorogênico e extrato de erva-mate	Clorogenato esterase
Gonzáles-Barrio et al. (2004)	Sucos de frutas (laranja e groselha) e chá verde	α -L-ramnosidases
Nielsen et al. (2006)	Suco de laranja	Hesperidinase
Silva (2011)	Chás (verde e mate) e sucos (laranja e limão)	Hesperidinase, naringinase, glicosidase e β -galactosidase
Sun, Tang e Powers (2005)	Suco de aspargo	Enzimas pectolíticas com atividade de rutinase

A tanino acil hidrolase, conhecida como tanase (EC 3.1.1.20), catalisa a hidrólise das ligações éster presentes em taninos hidrolisáveis e ésteres de ácido gálico (AGUILAR et al., 2007). Em estudo de Battestin, Macedo e Freitas (2008) foi avaliada a atividade da tanase de *Paecilomyces variotii* na hidrólise de EGCG sendo as propriedades antioxidantes, antes e após a reação enzimática, determinadas pelo ensaio do sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e pelo potencial redutor do íon férrico (FRAP). Como substratos para a hidrólise enzimática por tanase foram utilizados um padrão comercial de EGCG e extrato de chá verde. Os resultados indicaram uma total bioconversão da EGCG em ácido gálico e EGC (Figura 1) e os produtos da reação apresentaram maior capacidade antioxidante que os substratos avaliados.

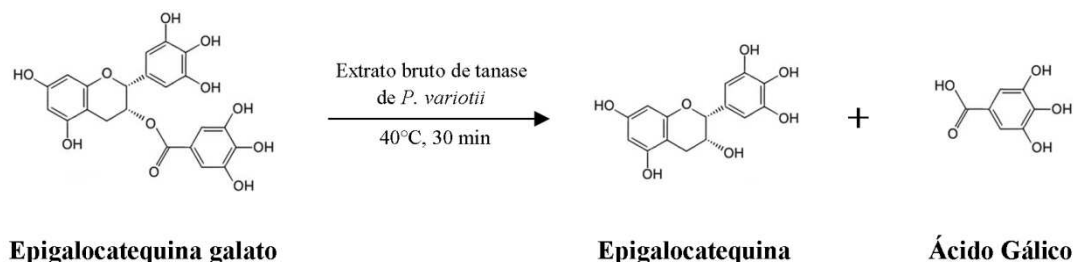


Figura 1: Biotransformação de epigallocatequina galato por tanase de *Paecilomyces variotii*.
Fonte: Battestin, Macedo e Freitas (2008) e Macedo et al. (2011).

Em outro estudo aplicando tanase de *Paecilomyces variotii* como biocatalisador, Macedo et al. (2011) avaliaram as propriedades antioxidantes dos extratos de chá verde (*Camellia sinensis*) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*) antes e depois da biotransformação enzimática catalisada pela tanase. Dois padrões comerciais, ácido clorogênico e EGCG, e os extratos obtidos a partir do chá verde e erva-mate foram utilizados como substratos. O poder antioxidante de todos os substratos, avaliado pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio), aumentou após o tratamento enzimático, demonstrando um grande potencial para a aplicação da tanase no aumento da atividade antioxidante de fontes de polifenóis.

A hidrólise do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) também foi investigada por Rivelli et al. (2011) como uma estratégia para melhorar a biodisponibilidade dos polifenóis da matriz. O padrão ácido clorogênico e o extrato de erva-mate foram utilizados como substrato da reação com uma enzima comercial clorogenato esterase de *Aspergillus japonicas*. Os extratos apresentaram alta atividade antioxidante após o tratamento enzimático quando avaliados pelo método de sequestro dos radicais DPPH, no entanto, o teor de fenólicos totais dos extratos e a atividade antioxidante determinada pelo método ORAC não apresentaram diferença significativa antes e após reação enzimática. Nas análises *in vivo*, os animais de experimentação que receberam o extrato hidrolisado apresentaram aumento na concentração plasmática de ácido cafeico e consequentemente maior capacidade antioxidante do plasma. O ácido cafeico foi também encontrado no fígado dos animais que receberam doses múltiplas do extrato hidrolisado, o que foi relacionado com uma melhoria da distribuição *in vivo* deste composto.

Dentre as classes de polifenóis, os flavonoides possuem uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado e estão divididos nas classes flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, flavanonas e flavanóis, de acordo com o tipo de heterociclo envolvido (MANACH et al., 2004). Os flavonoides presentes em frutos cítricos incluem flavanonas (naringina, hesperidina), flavonas (luteolina) e flavonóis (rutina, kaempferol, quercetina), no entanto, as flavanonas são os flavonoides mais abundantes (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997). Gonzáles-Barrio et al. (2004) investigaram a biotransformação de flavonoides glicosilados presente nos sucos de laranja e groselha e em chá verde por meio da aplicação de α -L-ramnosidases de *Aspergillus aculeatus*. Alíquotas do controle e das amostras tratadas com a ramnosidase foram retiradas em diversos tempos de reação e os flavonoides glicosilados (antocianinas em suco de groselha, flavanonas em suco de laranja e flavonóis no chá verde) foram identificados e quantificados. Os resultados mostraram que a enzima foi capaz de remover os grupos terminais ramnose dos flavonoides nas três bebidas, no entanto, a atividade antioxidante dos produtos não foi avaliada.

Os efeitos sobre a biodisponibilidade da aglicona hesperetina foi investigada por Nielsen et al. (2006) em um estudo duplo-cego cruzado, randomizado, em seres

humanos. Os voluntários consumiram suco de laranja com hesperidina naturalmente presente (hesperetina-7-O-rutinosídeo), suco de laranja tratado com a enzima hesperidinase ou suco de laranja fortificado com hesperidina. Uma melhoria significativa na biodisponibilidade da aglicona hesperetina foi observada após modificação enzimática do suco de laranja. Os resultados mostraram que o pico de concentração plasmática da aglicona nos indivíduos que consumiram o suco biotransformado, isso é, o suco contendo a hesperetina-7-glicosídeo gerado após a remoção do grupo ramnose da hesperidina pela enzima hesperidinase, foi quatro vezes superior ao suco não tratado e 1,5 vezes maior do que o suco fortificado.

Em estudo de Silva (2011) foi avaliado a biotransformação dos flavonoides de chás (mate e verde) e sucos (laranja e limão) pelas enzimas comercialmente disponíveis hesperidinase, naringinase, glicosidase e β -galactosidase. Os resultados mostraram que as amostras de chá apresentaram maior teor de polifenóis do que as amostras de sucos. Além disso, também foi observado um aumento significativo na atividade antioxidante, pelo ensaio ORAC, de todas as amostras após as reações de biotransformação, principalmente para os sucos de laranja e limão. A análise em espectrofotômetro de massas das amostras biotransformadas indicou a ação das enzimas na hidrólise das frações glicosídicas dos flavonoides, em especial da rutina, hesperidina e do kaempferol glicosilado, gerando compostos com maior capacidade antioxidante.

As enzimas pectolíticas têm a capacidade de degradar as substâncias pécicas de plantas e são geralmente utilizadas para clarificar, filtrar e aumentar o rendimento de sucos (WHITAKER, 1994). A preparação bruta de enzimas pectolíticas geralmente possui uma atividade enzimática principal e pode apresentar várias outras atividades secundárias, como hemicelulases, celulasas, esterases e glicosidases (BARBE; DUBOURDEU, 1998). Um estudo de Sun, Tang e Powers (2005) avaliou a composição fenólica e as propriedades antioxidantes do suco de aspargos após reação com diferentes preparações pectolíticas e também avaliou a presença da atividade de rutinase em tais preparações. A atividade antioxidante do suco de aspargos foi analisada de acordo com os métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)). A atividade enzimática de rutinase foi encontrada em sete das oito preparações pectolíticas testadas.

Embora tenha sido observada uma bioconversão de rutina em quercetina, e a atividade antioxidante da quercetina tenha sido maior do que da rutina, não foi verificado maior atividade antioxidante no suco de aspargos tratado. A bioconversão de rutina em quercetina (Figura 2) mostrou baixa contribuição para a atividade antioxidante total do suco de aspargos e foram sugeridas como causas: uma dependência da concentração e estrutura dos antioxidantes e uma interação entre os demais antioxidantes da matriz.

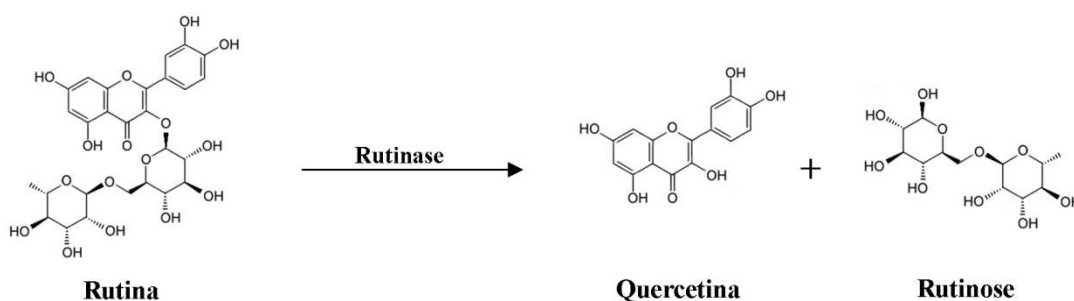


Figura 2: Hidrólise da rutina pela enzima rutinase formando quercetina.

Fonte: Adaptado de Sun, Tang e Power (2005).

2.1.2 Cereais

Os cereais integrais contêm quantidades significativas de fitoquímicos bioativos como os compostos fenólicos. Os ácidos fenólicos estão presentes em todos os cereais e podem ser encontrados tanto na forma livre como na forma conjugada (DYKES; ROONEY, 2007). O ácido ferúlico é o ácido fenólico mais comumente encontrado nos cereais, mas geralmente está na forma esterificada (MANACH et al., 2004). Além dos ácidos fenólicos, outros compostos fenólicos, como lignanas, taninos e flavonoides, também podem ser encontrados em cereais (DYKES; ROONEY, 2007). A Tabela 2 resume alguns estudos que empregaram a biotransformação de polifenóis de cereais utilizando micro-organismos e enzimas.

Tabela 2: Estudos de biotransformação de polifenóis em cereais com diferentes micro-organismos e enzimas.

Referência	Substrato	Micro-organismos	Enzima
Moore et al. (2006)	Farelo de trigo		β -glucanases, poligalacturonase, celulase, aminopeptidase e esterase de fígado suíno
Anson et al. (2009, 2011)	Farelo de trigo	Levedura comercial para pão	Mistura de enzimas contendo principalmente xilanase, celulase, β -glucanase, α -amilase e esterase de ácido ferúlico
Dorđević, Šiler-Marinković e Dimitrijević-Branković (2010)	Trigo mourisco, gérmen de trigo, cevada e centeio	<i>L. rhamnosus</i> e <i>S. cerevisiae</i>	

No trabalho de Moore et al. (2006), foi utilizado uma reação enzimática em estado sólido a fim de aumentar o teor de ácidos fenólicos livres e as propriedades antioxidantes de farelo de trigo. Cinco preparações de enzimas comercialmente disponíveis e uma enzima purificada foram avaliadas como biocatalisadores, sendo a reação realizada à temperatura ambiente em ausência de luz durante 72 horas. Os resultados mostraram que as propriedades antioxidantes do farelo de trigo tratado, determinadas pelos métodos ORAC e de sequestro dos radicais DPPH, ABTS e hidroxil, foram dependentes da quantidade e do tipo de enzima utilizados. Além disso, o aumento da atividade antioxidante observado no farelo de trigo tratado foi associado como uma provável consequência da hidrólise enzimática, verificada por cromatografia líquida de alta eficiência, dos ácidos fenólicos ligados para ácidos fenólicos livres. Assim, os autores avaliaram como potencial o uso da reação enzimática em estado sólido para melhorar a bioacessibilidade de compostos fenólicos em farelo de trigo.

Para os estudos de Anson et al. (2009) foram preparados pão branco, pão integral, pão integral com farelo de trigo integral, pão integral com farelo de trigo fermentado e pão integral com farelo de trigo fermentado e tratado enzimaticamente. A

biotransformação do farelo de trigo foi responsável por aumentar o teor de ácidos fenólicos livres nos pães contendo o farelo biotransformado. A bioacessibilidade dos ácidos fenólicos dos pães foi determinada por um simulador de digestão *in vitro* composto pela parte superior do trato gastrointestinal e os resultados mostraram uma forte correlação entre a percentagem de ácido ferúlico livre no pão e a bioacessibilidade deste composto. No entanto, a maior parte dos ácidos fenólicos permaneceu na fração não bioacessível e assim, o metabolismo desses compostos foi investigado com um modelo *in vitro* de cólon humano. Os resultados mostraram uma diminuição de ácido ferúlico total (livre e esterificado), principalmente para os pães com farelo biotransformado, indicando um rápido metabolismo dos compostos fenólicos livres, mas esses metabólitos não tiveram sua atividade biológica avaliada.

Em outro estudo, Anson et al. (2011) investigaram o efeito do farelo de trigo biotransformado em pão integral na biodisponibilidade dos compostos fenólicos, na capacidade antioxidante pós-prandial do plasma e na resposta anti-inflamatória *ex vivo*. Foi empregado um estudo cego e cruzado com oito homens saudáveis onde os participantes, após um período com uma dieta controlada, consumiram 300 g de pão integral ou contendo farelo de trigo integral (controle) ou contendo farelo de trigo biotransformado (pão biotransformado). Amostras de urina e sangue foram coletadas durante 24 horas em intervalos determinados para analisar os ácidos fenólicos e seus metabólitos. Os resultados indicaram maior biodisponibilidade dos ácidos ferúlico, vanílico, sinápico, e 3,4-dimetoxibenzóico com o pão biotransformado. Além disso, a concentração de ácido ferúlico no plasma apresentou correlação com a capacidade antioxidante no mesmo quando avaliada pelo ensaio de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). Os resultados também mostraram que a absorção de ácido ferúlico ocorre principalmente no intestino delgado e, em vez de uma segunda fase de absorção no cólon, os principais metabólitos observados foram provenientes do metabolismo do ácido ferúlico. O consumo do pão biotransformado ainda levou a uma diminuição da relação das citocinas pró/anti-inflamatórias no sangue quando induzidas pela ação de lipopolissacarídeos de *E.coli*.

Đorđević, Šiler-Marinković e Dimitrijević-Branković (2010) avaliaram a influência da fermentação de diferentes cereais no teor de compostos fenólicos totais e na

atividade antioxidante destes quando comparados com os seus homólogos não fermentados. Os cereais estudados foram trigo mourisco, gérmen de trigo, cevada e centeio. Para cada um dos cereais foram preparadas três amostras, sendo a primeira inoculada com *Lactobacillus rhamnosus*, a segunda inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* e a terceira sem qualquer tipo de inoculação (controle). Todas as amostras foram fermentadas a 30°C durante 24 horas. A capacidade antioxidante das amostras foi determinada utilizando os métodos de sequestro dos radicais DPPH, FRAP e pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). Os autores observaram um aumento no teor de fenólicos totais nas amostras fermentadas e maior atividade antioxidante nas amostras fermentadas com *L. rhamnosus*. Contudo, em comparação com as amostras controle, o aumento da atividade antioxidante dos cereais fermentados não foi muito representativo.

2.1.3 Derivados de soja e outras leguminosas

A soja é uma fonte rica de isoflavonas e outros compostos fenólicos (MCCUE; HORII; SHETTY, 2004). O grão de soja contém três tipos de isoflavonas em quatro estruturas químicas: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os conjugados malonil glicosídeos e acetil glicosídeos (KUDOU et al., 1991). Os produtos de soja fermentada são ricos em agliconas, que são mais facilmente absorvidos do que as formas conjugadas e, além disso, mostram uma maior afinidade para os receptores de estrogênio (MCCUE; HORII; SHETTY, 2004; SETCHELL, 2000). Em substratos fermentados, tem-se observado uma associação da atividade de β -glicosidase fúngica com o aumento do teor de fenólicos totais, sugerindo que essa enzima pode desempenhar um papel importante na liberação das agliconas e ainda aumentar a atividade antioxidante dos substratos (RANDHIR; VATTEM; SHETTY, 2004). Diferentes estudos com micro-organismos produtores de β -glicosidase estão resumidos na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Estudos de biotransformação de polifenóis em produtos de soja com diferentes micro-organismos.

Referência	Substrato	Micro-organismos produtores de β -glicosidase
Cho et al. (2009)	<i>Cheonggukjang</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
Cho et al. (2011)	<i>Cheonggukjang</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Lin, Wei e Chou (2006)	<i>Koji</i>	<i>A. sojae</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. awamori</i> , <i>Actinomucor taiwanensis</i> e <i>Rhizopus</i> sp.
Nam et al. (2011)	<i>Meju</i>	<i>A. oryzae</i>
Tsangalis et al. (2002)	Leite de soja	<i>B. pseudolongum</i> , <i>B. longum</i> -a, <i>B. longum</i> -b, <i>B. animalis</i> , e <i>B. infantis</i>
Pyo, Lee e Lee (2005)	Leite de soja	<i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>B. breve</i> e <i>B. thermophilum</i>
Wang, Yu e Chou (2006)	Leite de soja	<i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophiles</i> , <i>B. infantis</i> e <i>B. longum</i>
Wang et al. (2011)	Farinha de amendoim	<i>B. longum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>L. plantarum</i>

Em estudo de Park et al. (2001), as isoflavonas foram extraídas a partir de farinha de soja desengordurada e foram avaliadas quanto o teor de agliconas após um processo de aquecimento e reação com β -glicosidase fúngica. Antes da extração, parte da farinha de soja desengordurada foi aquecida a 100°C, parte foi aquecida a 121°C e outra parte foi mantida em temperatura ambiente (controle). Após extração com metanol das isoflavonas das amostras de farinha de soja tratadas e do controle, os extratos foram secos e incubados com β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* em tampão pH 5,0 durante 30 minutos. Os resultados indicaram que a aplicação de tratamento térmico a 121°C e a reação com β -glicosidase combinadas converteu quase todas as isoflavonas, inicialmente na forma de glicosídeos e malonil glicosídeos, para a forma aglicona. Além disso, todas as amostras de farinha de soja demonstraram maior atividade antioxidante após reação com β -glicosidase pelo ensaio de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico. A Figura 3 demonstra a biotransformação de uma glicosil-isoflavona (genistina) para a sua forma aglicona (genisteína) por meio da ação de uma β -glicosidase.

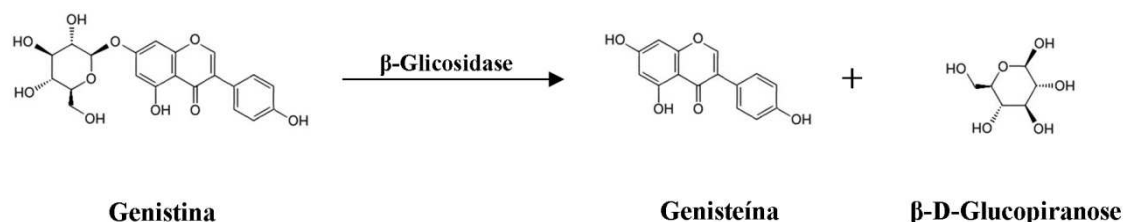


Figura 3: Transformação enzimática de glicosil-isoflavonas a agliconas.
 Fonte: Adaptado de Aguiar (2004).

O *cheonggukjang* é uma pasta de soja consumida geralmente por coreanos e é obtido a partir da fermentação da soja por *Bacillus* sp. No estudo de Cho et al. (2009), as atividades enzimáticas de β -glicosidase e esterase e os conteúdos de flavonoides e ácidos fenólicos foram investigados durante uma fermentação de 60 horas a 37°C de *cheonggukjang* por *Bacillus pumilus* HY1. Os resultados mostraram um aumento no teor de fenólicos totais com as 60 horas de fermentação. Os níveis das isoflavonas na forma aglicona e de acetil glicosídeos, dos flavanóis e de ácido gálico aumentaram com a fermentação, enquanto que diminuiu o teor das isoflavonas glicosiladas e malonil glicosídeos, assim como dos flavanóis conjugados com ácido gálico. As atividades enzimáticas de β -glicosidase e esterase aumentaram até as primeiras 36 horas de fermentação e depois diminuíram. Além disso, um aumento da atividade antioxidante, durante a fermentação de *cheonggukjang*, verificado pelo método de sequestro dos radicais DPPH, foi associado com um aumento no teor de compostos fenólicos totais. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudo de Cho et al. (2011) durante a fermentação de *cheonggukjang* por *Bacillus subtilis* CS90.

As propriedades antioxidantes do extrato de *koji* fermentado com diferentes micro-organismos iniciais foram avaliadas em estudo de Lin, Wei, Chou (2006). Para a preparação do *koji*, a soja sofreu um processo de cozimento e foi utilizada como substrato para fermentação durante três dias a 30°C com diferentes fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus sojae* BCRC 30103, *Aspergillus oryzae* BCRC 30222, *Aspergillus awamori*, *Actinomucor taiwanensis* e *Rhizopus* sp. O *koji* foi comparado com um controle não fermentado quanto ao teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelos métodos de

sequestro dos radicais DPPH, capacidade quelante dos íons Fe^{2+} e poder redutor. Foi observado um aumento no teor de fenólicos totais em todos os extratos que sofreram fermentação. Além disso, todos os extratos de soja fermentada, com exceção dos preparados com *Rhizopus* sp., apresentaram maior atividade antioxidante do que as amostras não fermentadas. Os melhores resultados foram obtidos com o micro-organismo *A. awamori*.

O *meju* é um produto derivado da soja fermentada muito semelhante ao *kofi*. No estudo de Nam et al. (2011) a fermentação do *meju* por *Aspergillus oryzae* NL 5 a 30°C foi avaliada durante sete dias a fim de estabelecer o período com maior atividade antioxidante do produto. Variedades de soja com diferentes níveis de isoflavonas foram utilizadas como substrato e o potencial antioxidante das amostras foi avaliado pelos métodos FRAP e ABTS. Além disso, ensaios de atividade antioxidante utilizando sondas fluorescentes em células Hepalcl7 também foram conduzidos para as amostras. Os resultados mostraram um aumento de concentração de compostos fenólicos totais nos produtos fermentados, provavelmente devido ao acúmulo das formas livres das isoflavonas. A medida de atividade antioxidante mais elevada, avaliada por todos os métodos citados, foi observada nas amostras de soja fermentada durante quatro e cinco dias, sendo que a fermentação por mais de seis dias reduziu os efeitos antioxidantes.

Diferentes estudos com leite de soja, o extrato aquoso de grão de soja, tem utilizado a fermentação com o intuito de aumentar a concentração das isoflavonas bioativas (agliconas) nesse substrato. Tsangalis et al. (2002) utilizaram cepas selecionadas de *Bifidobacterium* sp. para fermentar leite de soja a 37°C durante 48 horas e investigaram os níveis de isoflavonas na forma de glicosídeos, agliconas e equol (potente metabólito da daidzeína) após a reação. Os resultados indicaram um aumento na quantidade das agliconas de 8% no leite de soja não fermentado para cerca de 50% no leite de soja fermentado por *Bifidobacterium*. Além disso, o equol foi pela primeira vez isolado e quantificado em produtos fermentados de soja.

A aplicação de culturas de bactérias lácticas produtoras de β -glicosidase na fermentação de leite de soja também apresentou grande potencial para o aumento de isoflavonas bioativas nesse substrato. Pyo, Lee e Lee (2005) incubaram leite de soja a

37°C durante 48 horas individualmente com quatro micro-organismos, duas cepas de *Lactobacillus* e duas cepas de *Bifidobacterium*. Os resultados mostraram significativa bioconversão das glicosil-isoflavonas para as formas agliconas, sendo que as cepas de *Lactobacillus* sp. apresentaram maior proliferação em leite de soja do que as cepas de *Bifidobacterium* sp. e, portanto, foram capazes de concluir a hidrólise das glicosil-isoflavonas mais rapidamente.

Em outro estudo com a aplicação de bactérias lácticas na fermentação de soja, Wang, Yu, Chou (2006) investigaram os efeitos individuais e coletivos do uso de culturas de bactérias lácticas e bifidobactérias na capacidade antioxidante de leite de soja fermentado. Neste estudo, a atividade antioxidante das amostras foi avaliada pelos métodos de poder redutor, da inibição da autooxidação do ascorbato e do sequestro de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Exceto pelo método do sequestro de radicais H_2O_2 , os resultados mostraram maior atividade antioxidante do leite de soja fermentado quando comparado com a matriz não fermentada, no entanto, uma variação foi observada entre as diferentes culturas de micro-organismos empregadas. O fato do leite de soja fermentado não mostrar nenhum efeito no sequestro dos radicais H_2O_2 foi atribuído à formação de H_2O_2 pelos próprios micro-organismos fermentadores. A atividade antioxidante também aumentou com o uso simultâneo de bactérias lácticas e bifidobactérias. Além disso, quando os leites fermentados sofreram processo de secagem por spray-dryer ou liofilização, foi observada uma redução na atividade antioxidante destes, mas ainda assim, os resultados foram maiores do que para o leite de soja seco e não fermentado.

A fermentação láctica também mostrou ser um bom processo para obtenção de farinha de amendoim com maior atividade antioxidante. Wang et al. (2011) fermentaram farinha de amendoim a 37°C com bactérias lácticas e avaliaram a atividade antioxidante e os conteúdos em ácidos fenólicos e flavonoides após 72 horas de reação. Os micro-organismos *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum* foram empregados na fermentação da farinha. Os resultados de atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH, capacidade quelante dos íons Fe^{2+} e poder redutor mostraram dependência com o tipo de micro-organismo

utilizado, mas em geral foi maior na farinha de amendoim biotransformada. O teor de ácidos fenólicos diminuiu com a fermentação, todavia, foi observada uma significativa bioconversão de rutina em quercetina, o que sugeriu correlação entre o aumento na atividade antioxidante da farinha de amendoim biotransformada com a concentração de quercetina na mesma.

2.1.4 Resíduos agro-industriais

Grandes quantidades de resíduos como sementes, cascas, bagaço entre outros, provenientes da agricultura e das indústrias de alimentos e cosméticos, são pouco valorizados e acabam sendo utilizados como ingredientes na alimentação animal, adubos ou ainda descartados no solo. Nos últimos anos, devido ao crescente interesse na extração de compostos fenólicos de fontes vegetais, esses resíduos se tornaram fontes de matéria-prima potenciais para a produção de diferentes compostos fenólicos bioativos em consequência de seu baixo custo e ampla disponibilidade (MARTINS et al., 2011; WIJESINGHE et al., 2012; ZHENG; SHETTY, 1998). A Tabela 4 resume alguns estudos que empregaram micro-organismos para a biotransformação de polifenóis em resíduos agro-industriais.

Tabela 4: Estudos de biotransformação de polifenóis de resíduos agro-industriais com diferentes micro-organismos.

Referências	Substrato	Micro-organismos
Zheng e Shetty (2000) e Vatter e Shetty (2003)	Bagaço de oxicoco	<i>Lentinus edodes</i>
Correia et al. (2004)	Resíduos de goiaba	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Madeira Jr., Macedo e Macedo (2012)	Bagaço de laranja	<i>Paecilomyces variotii</i>

O bagaço de oxicoco ou *cranberry* é um subproduto da indústria do processamento de oxicoco e consiste principalmente de cascas, sementes e hastes (ZHENG, SHETTY, 1998). Este resíduo contém quantidades consideráveis de compostos fenólicos principalmente na forma conjugada com glicose e outros açúcares. O potencial de bioconversão destes glicosídeos fenólicos do bagaço de oxicoco foi investigado em estudo

de Zheng e Shetty (2000) empregando fermentação em estado sólido durante 60 dias a 25°C pelo fungo *Lentinus edodes*, também conhecido como shiitake. Após 30 dias, o teor de compostos fenólicos livres aumentou drasticamente, e ainda, com correlação com a atividade enzimática de β -glicosidase. Os principais compostos fenólicos livres identificados a partir de bagaço de oxicoco fermentado foram ácido gálico, ácido clorogênico, ácido p-hidroxibenzoico e p-cumárico. O fungo *L. edodes* mostrou capacidade de produzir níveis elevados de atividade de β -glicosidase e os resultados sugeriram que o bagaço de oxicoco é um substrato potencial para a produção de compostos fenólicos e β -glicosidase fúngica.

Em outro estudo com bagaço de oxicoco, Vatter e Shetty (2003) investigaram os efeitos da fermentação em estado sólido com fungo *Lentinus edodes* no teor de compostos fenólicos e também nas propriedades antioxidantes do bagaço de oxicoco. Os resultados também mostraram um aumento no conteúdo fenólico durante o período de fermentação, mas ainda foi observado um aumento na atividade antioxidante do bagaço pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e da inibição da oxidação do β -caroteno. Além disso, foi observado um considerável conteúdo de ácido elágico no bagaço biotransformado. O teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do bagaço de oxicoco apresentaram correlação com o aumento da atividade enzimática de β -glicosidase, indicando que essa enzima pode desempenhar um papel importante na liberação de agliconas e, por consequência, aumentar a capacidade antioxidante dos substratos.

Uma estratégia para melhorar o conteúdo de antioxidantes fenólicos em resíduos do processamento de goiaba foi desenvolvida por Correia et al. (2004), por meio da fermentação do resíduo de goiaba pelo micro-organismo *Rhizopus oligosporus*. Em um ensaio de 12 dias, foram avaliados dois substratos com diferentes proporções de resíduo de goiaba e farinha de soja, utilizada como fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que a fermentação por *R. oligosporus* aumentou em ambos os substratos o teor de fenólicos extraíveis em água. Além disso, o aumento no conteúdo fenólico indicou associação com a atividade enzimática de β -glicosidase e também sofreu influência da quantidade de farinha de soja utilizada. A atividade antioxidante, medida pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e da inibição da oxidação do β -caroteno, aumentou durante os estágios iniciais de

fermentação para ambos os substratos, mas diminuiu em seguida. Essa associação negativa entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante foi associada com uma possível polimerização nas fases iniciais de fermentação dos compostos fenólicos livres para compostos com maior atividade antioxidante, como resposta ao estresse gerado pela depleção de nutrientes.

Com o objetivo de produzir simultaneamente as enzimas tanase e fitase, Madeira Jr., Macedo e Macedo (2012) empregaram bagaço de laranja como substrato para fermentação em estado sólido por *Paecilomyces variotii* e também avaliaram o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante, pelo método ABTS, do bagaço de laranja durante a fermentação. O meio de fermentação constituiu de bagaço de laranja em solução salina e 10% de ácido tânico e, após a inoculação, foi incubado a 30°C durante 120 horas. Apesar dos níveis significativos de produção das enzimas tanase e fitase, os resultados não mostraram diferença entre o conteúdo de fenólicos totais no bagaço antes e depois da fermentação. No entanto, a capacidade antioxidante do bagaço de laranja aumentou aproximadamente dez vezes após o processo de fermentação, indicando uma forma potencial de aumentar o valor desse resíduo como um ingrediente para alimentação animal.

3 CONCLUSÕES

Os processos de hidrólise enzimática e fermentação de bebidas, cereais, soja, e resíduos agro-industriais mostraram ser um atraente meio para promover a biotransformação de compostos fenólicos conjugados e aumentar a concentração de compostos fenólicos livres nessas matrizes, sendo ainda capazes de melhorar a absorção, além da capacidade antioxidante e anti-inflamatória destes compostos. Ainda assim, são necessárias pesquisas que explorem novos substratos, enzimas e micro-organismos para essas reações e que avaliem o potencial de aplicação dos produtos biotransformados como antioxidantes naturais e como suplementos alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR, D.L. de. Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica *in vitro*. Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado, 285 p., 2004.

AGUILAR, C.N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 47-59, 2007.

ANSON, N.M. et al. Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6148-6155, 2009.

ANSON, N.M. et al. Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts anti-inflammatory effects *ex vivo*. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 137-143, 2011.

BALENTINE, D.A.; WISEMAN, S.A.; BOUWENS, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 8, p. 693-704, 1997.

BARBE, C.; DUBOURDIEU, D. Characterization and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78, p. 471-478, 1998.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. de. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 228-233, 2008.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.

BORGES, K.B. et al. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CASTRO, H.F. de; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Quimica Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CHO, K.M. et al. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. **Food Chemistry**, v. 114, p. 413-419, 2009.

CHO, K.M. et al. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during *cheonggukjang* soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 402-410, 2011.

COLLINS, A.M.; KENNEDY, M.J. Biotransformations and bioconversions in New Zealand: past endeavors and future potential. **Australasian Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 86-94, 1999.

CORREIA, R.T.P. et al. Phenolic antioxidant enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus* mediated solid-state bioprocessing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 28, p. 404-418, 2004.

D'ARCHIVIO, M. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DORDEVIC' T.M.; ŠILER-MARINKOVIC', S.S.; DIMITRIJEVIC'-BRANKOVIC, S.I. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. **Food Chemistry**, v. 119, p. 957-963, 2010.

DYKES, L.; ROONEY, L.W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. **Cereal Foods World**, v. 52, n. 3, p. 105-111, 2007.

ESCARPA, A.; GONZALES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

GEORGETTI, S.R. et al. Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 459-466, 2009.

GONZÁLES-BARRIO, R. et al. Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6136-6142, 2004.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, 2008.

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

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

KUDOU, S. et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glicine max* Merrill). **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.

LIN, C.; WEI, Y.; CHOU, C. Enhanced antioxidative activity of soybean *koji* prepared with various filamentous fungi. **Food Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 628-633, 2006.

MACEDO, J.A. et al. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, p. 491-497, 2011.

MADEIRA JR., J.V.; MACEDO, J.A.; MACEDO, G.A. A new process for simultaneous production of tanase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 477-482, 2012.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation - a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MCCUE, P.; HORII, A.; SHETTY, K. Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edodes* during solid-state bioprocessing is associated with enhanced production of laccase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 385-392, 2004.

MOORE, J. et al. Effects of solid-state enzymatic treatments on the antioxidant properties of wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9032-9045, 2006.

NAM, D.H. et al. Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. H194-H200, 2011.

NIELSEN, I.L.F. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 404-408, 2006.

PARK, Y.K. et al. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food Science-South Korea**, v. 34, n. 4, p. 14-19, 2001.

PETERSEN, M.; KIENER, A. Preparation and functionalization of N-heterocycles. **Green Chemistry**, v. 1, p. 99-106, 1999.

PYO, Y.; LEE, T.; LEE, Y. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 38, p. 551-559, 2005.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 235-244, 2004.

RIVELLI, D.P. et al. Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8901-8907, 2011.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SETCHELL, K.D.R. Absorption and metabolism of soy isoflavones - from food to dietary supplements and adults to infants. **The Journal of Nutrition**, v. 130, 654S-655S, 2000.

SILVA, C.M.G. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de bebidas contendo polifenóis biotransformados**. Bragança Paulista, SP: Universidade São Francisco, 2011. 88p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

SUN, T.; TANG, J.; POWERS, J.R. Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 42-48, 2005.

TSANGALIS, N. et al. Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 3104-3113, 2002.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 367-379, 2003.

WANG, N. et al. Antioxidant activity of peanut flour fermented with lactic acid bacteria. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 1514-1521, 2011.

WANG, Y.; YU, R.; CHOU, C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 23, p. 128-135, 2006.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. p. 426, 1994.

WIJESINGHE, W.A.J.P. et al. Value-added fermentation of *Ecklonia cava* processing by-product and its antioxidant effect. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 2, p. 201-209, 2012.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 323-329, 1998.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 895-900, 2000.

CAPÍTULO II

ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DA TANASE DE *Paecilomyces variotii* FRENTE A DIFERENTES POLIFENÓIS

RESUMO

A tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20), conhecida como tanase, é uma enzima capaz de atuar em ligações éster e depsídicas de taninos hidrolisáveis. Estudos também demonstraram a ação dessa enzima em outros polifenóis como ácido clorogênico, epicatequina galato e epigallocatequina galato. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a especificidade do extrato semipurificado de tanase obtido de *Paecilomyces variotii* frente a diferentes padrões comerciais de polifenóis. Como substratos foram utilizados: os ácidos fenólicos elágico, ferúlico e clorogênico; o estilbeno resveratrol; e os flavonoides rutina, quercetina, naringina, hesperidina e hesperetina. As reações ocorreram em pH 7,4 e 40°C e os produtos das reações foram avaliados nos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação por CLAE-DAD e espectrometria de massas. Os resultados mostraram atuação do extrato semipurificado de tanase na hidrólise de rutina, naringina e hesperidina na ligação entre a aglicona e o dissacarídeo dos flavonoides estudados, indicando uma atividade diglicosídica. Não foi observada hidrólise do ácido clorogênico em ácido cafeico e ácido quínico nas condições empregadas para o teste, nem dos demais polifenóis testados como substrato. Nenhum outro trabalho encontrado relatou a hidrólise de flavonoides glicosilados por tanase, o que pode representar grande potencial da aplicação desse extrato no aumento da biodisponibilidade e bioatividade de polifenóis em alimentos.

Palavras-chave: Tanase, flavonoides glicosilados, especificidade, ligação glicosídica.

1 INTRODUÇÃO

Os polifenóis são considerados os antioxidantes mais abundantes na dieta humana, entretanto, a estrutura química desses compostos pode afetar suas propriedades biológicas como atividade antioxidante e interações específicas com receptores celulares e enzimas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Os polifenóis encontrados em plantas estão frequentemente conjugados com açúcares (principalmente glicose) o que reduz a capacidade antioxidante destes compostos, pois a conjugação com o grupo glicosídeo indisponibiliza grupos hidroxilo dos anéis fenólicos importantes para a estabilidade dos radicais livres (VATTEM; SHETTY, 2003).

Sendo assim, a hidrólise desses compostos fenólicos conjugados pode ser uma alternativa para aumentar a concentração de polifenóis livres e a atividade biológica de vários alimentos (GEORGETTI et al., 2009). Battestin, Macedo e Freitas (2008) estudaram a capacidade da tanase de *Paecilomyces variotii* em hidrolisar epigallocatequina galato de chá verde em epigallocatequina e ácido gálico e constataram a maior atividade antioxidante após a hidrólise enzimática.

Estudos indicaram que a tanase pode reagir com qualquer hidroxila fenólica, mas que para a formação de um verdadeiro complexo enzima-substrato, o substrato deveria ser um composto de éster de ácido gálico (IIBUCHI; MINODA; YAMADA, 1972). A literatura apresenta a tanase como uma enzima capaz de atuar nas ligações éster e depsídica de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, e ainda em substratos como ácido clorogênico, epicatequina galato e epigallocatequina galato (LEKHA; LONSANE, 1997). Além disso, já foi relatada a atuação da tanase na hidrólise da ligação β -1,4 do dissacarídeo celobiose (RAMÍREZ-CORONEL et al., 2003).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a especificidade enzimática do extrato semipurificado de tanase obtida do micro-organismo *Paecilomyces variotii* em relação a diferentes substratos polifenólicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos ou polifenóis são definidos quimicamente como substâncias com um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxilas ou derivados funcionais (ésteres, éteres de metila, glicosídeos, dentre outros) (ESCARPA; GONZALES, 2001). Os polifenóis apresentam estrutura química com potencial contra os radicais livres e têm se mostrado mais eficazes antioxidantes *in vitro* do que as vitaminas E e C (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Eles são considerados metabólitos secundários envolvidos na defesa química das plantas contra condições de estresse biótico e abiótico (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006). As principais fontes alimentares destes compostos são frutas e bebidas (sucos de fruta, vinho, chá, café, chocolate e cerveja) e, em menor grau, vegetais, leguminosas e cereais (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

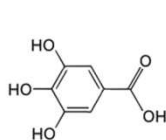
Os polifenóis estão divididos em diversas classes de acordo com o número de anéis aromáticos presentes na estrutura química e com os elementos estruturais que ligam estes anéis entre si (MANACH et al., 2004). São consideradas como principais classes de polifenóis os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas e taninos (D'ARCHIVIO et al., 2007; IGNAT; VOLF; POPA, 2009). A Figura 1 apresenta os principais representantes de cada classe de polifenol com destaque na cor vermelha para os compostos estudados no presente trabalho.

Os **ácidos fenólicos** são abundantes nos alimentos e podem ser responsáveis por um terço dos compostos fenólicos da dieta humana (YANG et al., 2001). Eles estão divididos em duas classes: os derivados de ácido benzóico, contendo sete átomos de carbono (C6-C1) e os derivados de ácido cinâmico, contendo nove átomos de carbono (C6-C3) (D'ARCHIVIO et al., 2007; FRESCO et al., 2006).

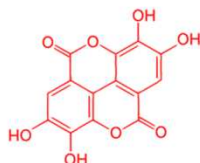
Os ácidos hidroxibenzóicos são frequentemente encontrados na forma ligada e como componentes de estruturas complexas como ligninas e taninos hidrolisáveis

(SHAHIDI; NACZK, 2004, p.3). Os ácidos vanílico e gálico são considerados as estruturas mais representativas do grupo, no entanto, apesar da diferença estrutural, o ácido elágico também é considerado um membro desta classe de polifenóis e assim como o ácido gálico, é monômero base para os taninos hidrolisáveis (ESCARPA; GONZALES, 2001).

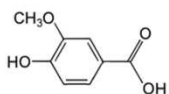
Ácidos Hidroxibenzoicos



Ácido Gálico

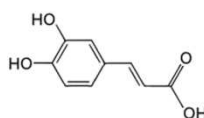


Ácido Elágico

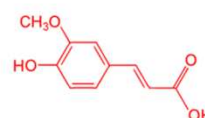


Ácido Vanílico

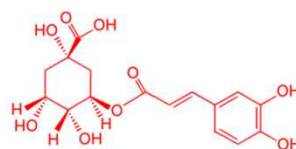
Ácidos Hidroxicinâmicos



Ácido Cafeico

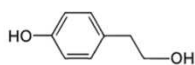


Ácido Ferúlico



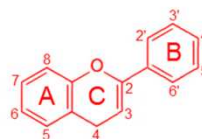
Ácido Clorogênico

Álcoois Fenólicos

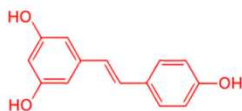


Tiroso

Flavonoides

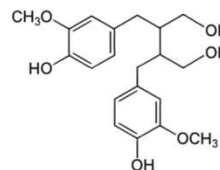


Estilbenos



Resveratrol

Lignan



Secoisolariciresinol

Figura 1: Classificação e exemplos de polifenóis (destaque para os compostos deste estudo).

Fonte: Adaptado de D'Archivio et al. (2007) e Martins et al. (2011).

Os ácidos hidroxicinâmicos, também conhecidos como fenilpropanóides, são representados principalmente pelos ácidos cafeico, ferúlico e cumárico e geralmente são

encontrados nas formas de derivados glicosilados ou de ésteres de ácido quínico, chiquímico ou tartárico (ESCARPA; GONZALES, 2001; D'ARCHIVIO et al., 2007). O ácido ferúlico é encontrado principalmente em farelos de cereais e geralmente está ligado covalentemente às paredes celulares das plantas, enquanto que o ácido cafeico pode ser encontrado esterificado ao ácido quínico, formando uma estrutura denominada de ácido clorogênico e encontrada em níveis extremamente elevados no café (KROON; WILLIAMSON, 1999).

Os **álcoois fenólicos**, como o tirosol (4-hidroxifeniletanol) e o hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), estão presentes principalmente em azeite de oliva extra virgem (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Os **estilbenos** são compostos que possuem dois anéis aromáticos, geralmente ligados por meio de uma cadeia etileno (FRESCO et al., 2006). O estilbeno mais característico é *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e está presente em uvas, vinho e amendoim (YANG et al., 2001).

As **lignanas** apresentam uma estrutura de 2,3-dibenzilbutano e são formadas pela dimerização de dois resíduos de ácido cinâmico. Diversas lignanas, tais como a secoisolariciresinol, são consideradas como fitoestrógenos. A linhaça é a principal fonte alimentar desse polifenol, apresentando principalmente secoisolariciresinol e em menor quantidade, matairesinol (PANDEY; RIZVI, 2009).

Os **flavonoides** são os polifenóis mais abundantes na dieta humana (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Eles possuem uma estrutura consistindo de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três átomos de carbono formando um heterociclo oxigenado (anel C) (MANACH et al., 2004). Vale ressaltar que, as moléculas de flavonoide não ligadas a qualquer outra substância química são denominadas agliconas, enquanto que as moléculas de flavonoides ligadas a açúcares são denominadas flavonoides glicosilados (ESCARPA; GONZALES, 2001).

Os flavonoides aparecem frequentemente como glicosídeos, sendo essa glicosilação responsável por conferir à molécula maior solubilidade em água, entretanto menor ação contra radicais livres. A glicose é o açúcar mais comumente encontrado ligado

as agliconas, embora também possa aparecer galactose, ramnose, arabinose, xilose, assim como, dissacarídeos, como a rutinose (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Os flavonoides estão divididos em classes de acordo com o grau de oxidação do heterociclo (anel C) em: flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, flavanonas e flavanóis (MANACH et al., 2004; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Além disso, a estrutura básica dos flavonoides permite diferentes padrões de substituição nos anéis aromáticos A e B dentro de cada classe de flavonoides como, por exemplo, hidroxilas fenólicas, açúcares, grupos metóxi, sulfatos ou glucoronídeos (HOLLMAN; KATAN, 1999). A Figura 2 apresenta os principais representantes de cada classe de flavonoide com destaque na cor vermelha para os compostos estudados no presente trabalho.

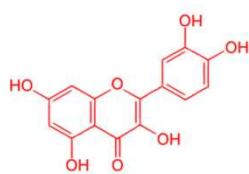
Os flavonóis são os flavonoides mais presentes nos alimentos (MANACH et al., 2004). Eles são caracterizados por uma ligação dupla entre C2 e C3 e um grupo hidroxilo na posição C3 (Figura 2) (D'ARCHIVIO et al., 2007). A quercetina, kaempferol, miricetina, morina, galangina e seus glicosídeos (por exemplo, rutina, quercitrina e astragalina) são os flavonóis predominantes (HUANG; CAI; ZHANG, 2010).

As flavonas constituem a classe de polifenóis menos representativa nos alimentos. As agliconas mais amplamente distribuídas correspondem a apigenina e luteolina que também podem aparecer nas formas glicosiladas (ESCARPA; GONZALES, 2001).

As isoflavonas possuem semelhanças estruturais com o estrogênio e, portanto são classificadas como fitoestrógenos. Elas são encontradas quase que exclusivamente em plantas leguminosas (MANACH et al., 2004). A genisteína e daidzeína são as agliconas mais abundantes nos grãos de soja, onde ocorrem como os glicosídeos genistina e daidzina, respectivamente (DAS; ROSAZZA, 2006).

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, responsáveis pela maior parte das cores vermelha, azul e roxa de frutas, legumes, flores e outros tecidos vegetais (MAZZA, CACACE; KAY, 2004). O termo antocianina refere-se à forma glicosídica de sua respectiva forma aglicona, denominada antocianidinas (BRAVO, 1998). Seis antocianidinas ocorrem mais frequentemente em alimentos: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (IGNAT; VOLF; POPA, 2009).

Flavonóis

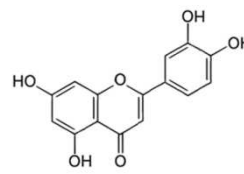


Quercetina



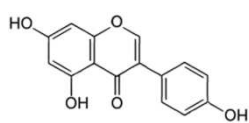
Rutina

Flavonas

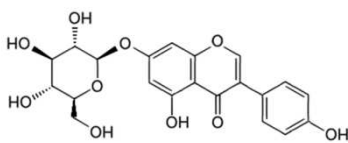


Luteolina

Isoflavonas

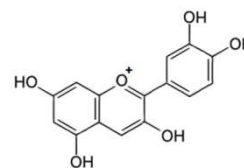


Genistina



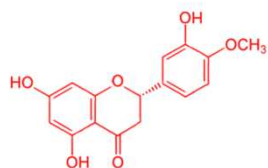
Genisteína

Antocianidinas

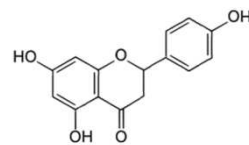


Cianidina

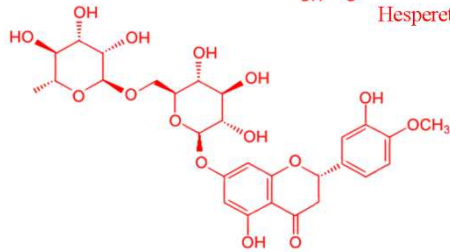
Flavanonas



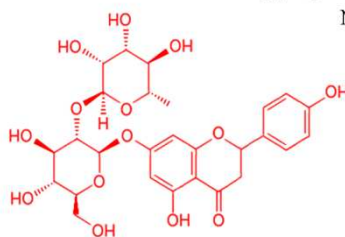
Hesperetina



Naringenina

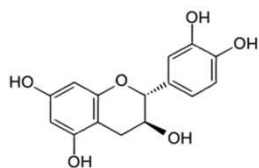


Hesperidina

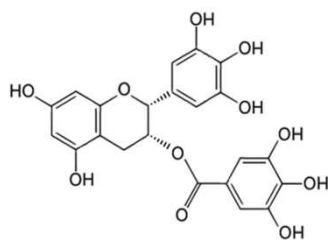


Naringina

Flavanóis



Catequina



Epigallocatequina galato

Figura 2: Classificação e exemplos de flavonoides (destaque para os flavonoides deste estudo).
Fonte: Adaptado de Martins et al. (2001) e Sakakibara et al. (2003).

As flavanonas são caracterizadas pela presença de uma cadeia saturada de três carbonos com um átomo de oxigênio na posição C4 (D'ARCHIVIO et al., 2007). Elas estão presentes em altas concentrações em frutas cítricas, mas também podem ser encontradas em tomate e algumas plantas aromáticas como a hortelã. Os principais representantes das agliconas são a naringenina em toranja, hesperetina em laranja e eriodictiol em limão, no entanto, são geralmente encontradas glicosiladas por um dissacarídeo, como a neohesperidose ou rutinose, na posição C7 (MANACH et al., 2004).

Os flavanóis são encontrados em uma grande variedade de vegetais, ervas e chás (DAS; ROSAZZA, 2006). Em sua estrutura, eles possuem uma cadeia saturada de três carbonos com um grupo hidroxilo na posição C3. Ao contrário de outras classes de flavonoides, os flavanóis não são encontrados na forma glicosilada em alimentos (D'ARCHIVIO et al., 2007). Seus representantes catequina, epicatequina e galocatequina são monômeros base de taninos condensados, embora também possam ser encontrados como monômeros livres (BRAVO, 1998).

A Tabela 1 apresenta as principais fontes de alimentos para cada classe de flavonoide.

Tabela 1: Presença de flavonoides em alimentos.

Classe de flavonoide	Principais fontes de alimentos
Flavanóis	Cebolas, couve, brócolis, maçãs, cerejas, chá, vinho tinto
Flavonas	Salsa, tomilho
Flavanonas	Frutos cítricos
Flavanóis	Maçãs, chá
Isoflavonas	Soja, legumes
Antocianidinas	Cerejas, uvas

Fonte: Adaptado de Hollman e Katan (1999).

Os **taninos** são polifenóis de alta massa molecular e geralmente classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 3). Estas estruturas possuem uma elevada capacidade de associação com outros polímeros biológicos, tais como proteínas e

carboidratos e com base nesta propriedade, eles têm sido atribuídos como antinutrientes (ESCARPA; GONZALES, 2001). Os taninos são comuns em plantas e em alimentos de origem vegetal, especialmente em frutas, leguminosas, cereais e bebidas (vinho, chá, chocolate e sidra) (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

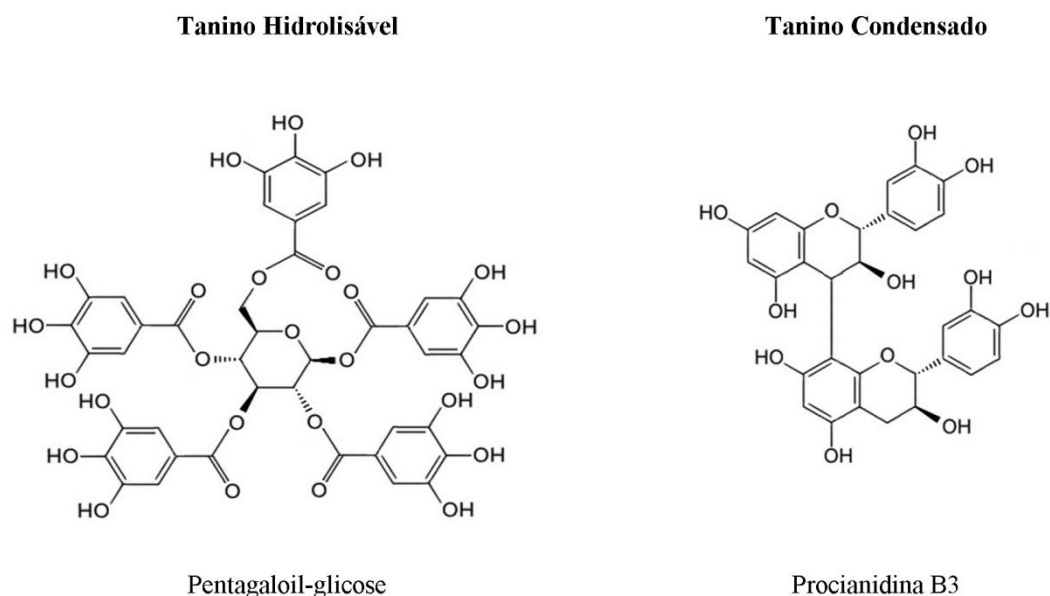


Figura 3: Estruturas representativas dos taninos.
 Fonte: Adaptado de Ignat, Volf e Popa (2009).

Os taninos hidrolisáveis são compostos por ésteres de ácido gálico (galotanino) ou ácido elágico (elagitaninos) com um núcleo de açúcar, geralmente glicose, e são prontamente hidrolisados por ácidos ou enzimas como a tanase, em seus monômeros base (BHAT; SINGH; SHARMA, 1998). O tanino hidrolisável mais conhecido é o ácido tânico, um galotanino composto por uma molécula de pentagalloyl-glicose, esterificada com mais cinco unidades de ácido gálico (BRAVO, 1998).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são muito mais comuns na dieta humana do que os taninos hidrolisáveis e são compostos por unidades monoméricas de flavanóis (catequina, epicatequina, entre outros) unidos entre si por ligações C-C e ocasionalmente por ligações C-O-C (BRAVO, 1998; ESCARPA; GONZALES, 2001, SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000). Os taninos condensados podem conter de duas a

cinquenta ou mais unidades flavonoides e em razão de suas estruturas químicas, sem a presença de ligações éster e depsídicas, estes não são susceptíveis a hidrólise por tanase (PINTO et al., 2003).

2.2 TANINO ACIL HIDROLASE

A definição clássica para a tanase ou tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) é uma hidrolase capaz de atuar em ligações éster e ligações depsídicas de taninos hidrolisáveis, como o ácido tânico, produzindo glicose e ácido gálico (Figura 4) (LEKHA; LONSANE, 1997).

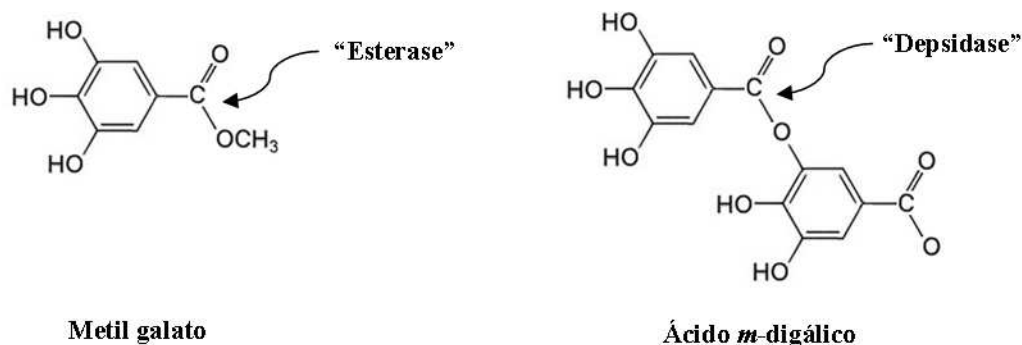


Figura 4: Atividades esterásicas e depsídicas da tanase.
Fonte: Adaptado de Lekha e Lonsane (1997).

Embora a tanase possa ser encontrada em plantas e animais, os micro-organismos são as fontes mais importantes para a sua obtenção (LEKHA; LONSANE, 1997). A tanase é produzida na presença de ácido tânico por vários fungos filamentosos, principalmente, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* (RAMÍREZ-CORONEL et al., 2003), mas estudos também mostram a produção de tanase por bactérias (MONDAL; BANERJEE; PATI, 2000; SELWAL et al., 2010) e leveduras (AOKI; SHINKE; NISHIRA, 1976 a,b).

A tanase produzida por fungos é uma glicoproteína geralmente extracelular e apresenta pH de estabilidade na faixa de 3.5-8.0, temperatura de estabilidade entre 30°C e 60°C, ponto isoelétrico de 4.0-4.5 e massa molecular entre 186 kDa e 300 kDa, dependendo

fortemente das condições de cultura e também da linhagem utilizada (AGUILAR; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ 2001). A Tabela 2 apresenta alguns estudos que utilizaram fungos para a produção de tanase e as condições utilizadas na inoculação.

Tabela 2: Exemplos de fungos utilizados para a produção de tanase e condições ótimas de inoculação.

Fungo	Substrato	Condições de inoculação	Referência
<i>Aspergillus foetidus</i>	Resíduo de frutas com alto teor de taninos	30°C / 72 horas	Mukherjee e Banerjee (2003)
<i>Aspergillus fischerii</i>	Meio mineral + 0,1% pentagaloil-glicose	30°C / 48 horas	Bajpai e Patil (1997)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Meio Czapek-Dox + 0,2% glicose + 2% ácido tânico	30°C / 24 horas	Bradoo, Gupta e Saxena (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	Meio mineral + 0,1% ácido tânico, em suporte sólido de poliuretano	30°C / 24 horas	Ramírez-Coronel et al. (2003)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz + solução de sais com 4% de ácido gálico	35°C / 72 horas	Paranthaman et al. (2008)
<i>Fusarium solani</i>	Meio batata-dextrose + 0,1% pentagaloil-glicose	30°C / 48 horas	Bajpai e Patil (1997)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Farelo de trigo e casca de café + solução 10% de ácido tânico	30°C / 120 horas	Battestin e Macedo (2007a,b)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Meio Czapek-Dox + 2% ácido tânico	28°C / 120 horas	Rajakumar e Nandy (1983)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Resíduos de frutas com alto teor de taninos	30°C / 60 horas	Mukherjee e Banerjee (2003)
<i>Trichoderma viride</i>	Meio batata-dextrose + 0,1% pentagaloil-glicose	30°C / 48 horas	Bajpai e Patil (1997)

O extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* utilizado neste trabalho foi previamente caracterizado por Battestin e Macedo (2007b,c) sendo que este apresenta pH estável na faixa de 4,0-7,5, com pH ótimo de 6,5 e temperatura de estabilidade entre 20 e 70°C, com temperatura ótima de 70°C. Nos mesmos estudos, a tanase purificada de *Paecilomyces variotii* foi caracterizada como uma proteína

monomérica com massa molecular de 87,3 kDa, também presente em uma forma menos ativa de 71,5 kDa e com atividade ótima em pH 5,5 e 55°C e estabilidade na faixa de pH 4,5-6,5 e temperatura de 40-65°C.

A literatura apresenta a tanase como uma enzima capaz de hidrolisar aqueles substratos que contêm pelo menos dois grupos OH fenólicos no componente ácido e onde o grupo COOH esterificado esteja presente no anel aromático oxidado e em posição diferente de *orto* com um dos grupos OH fenólicos (LEKHA; LONSANE, 1997). Assim, a tanase catalisa a decomposição de taninos hidrolisáveis como ácido tânico, metil galato, etil galato e n-propilgalato (Figura 5) (AGUILAR et al., 2007).

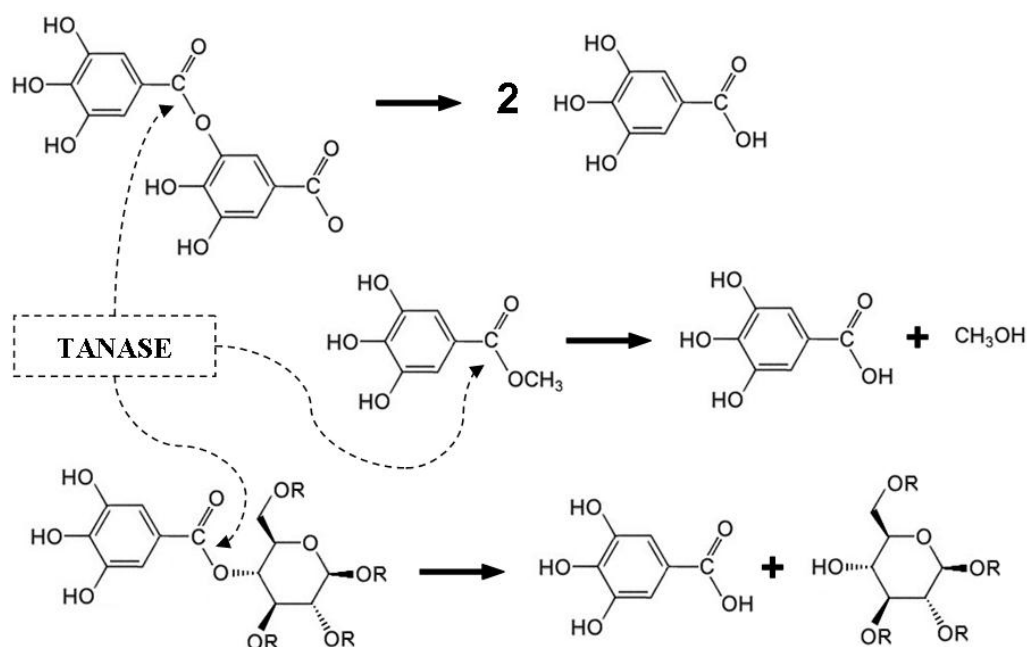


Figura 5: Mecanismo de ação da tanase.
Fonte: Adaptado de Aguilar et al. (2007).

Estudos também demonstram a atuação da tanase na hidrólise de (-)-epicatequina galato e (-)-epigallocatequina galato (BATTESTIN; MACEDO; FREITAS, 2008; LU; CHEN, 2008; YAO et al., 2011). O ácido clorogênico, apesar de possuir dois OH fenólicos, seria resistente à ação da tanase devido à presença de uma dupla ligação na cadeia lateral que contém o grupo COOH, entretanto, a literatura tem mostrado a atuação

desta enzima na hidrólise de ácido clorogênico, com a formação de ácido cafeico e ácido quínico (LEKHA; LONSANE, 1997; YAO et al., 2011).

Embora existam muitas aplicações industriais em potencial para a tanase, sua utilização é limitada essencialmente pelo alto custo de produção, bem como pelo conhecimento insuficiente de suas propriedades, das condições ótimas de produção e de aplicação em grande escala. O potencial de atuação da tanase abrange indústrias de alimentos, rações, bebidas, farmacêuticas e químicas (LEKHA; LONSANE, 1997) e geralmente está relacionado com a minimização dos efeitos indesejáveis causados pelos taninos presentes em produtos alimentares e bebidas (AGUILAR et al., 2007).

Uma das principais aplicações comerciais da tanase é o emprego no processamento de chá instantâneo, a fim de eliminar complexos insolúveis, conhecidos como “creme do chá”, resultados da polimerização de polifenóis (taninos e cafeína) em baixas temperaturas (SANDERSON et al., 1974). Outra importante aplicação de tanase é na produção de ácido gálico e propil galato. O ácido gálico é utilizado na indústria farmacêutica para a síntese de antibióticos e na indústria alimentícia como substrato para a síntese química de conservantes alimentícios e o propil galato é um antioxidante alimentício muito importante (SELWAL et al., 2010). Outros potenciais usos da tanase estão no aumento da estabilidade na cor de vinhos, na clarificação de sucos de frutas e bebidas geladas à base de café, no tratamento de efluentes gerados no processamento do couro e ácido tânico e na redução dos efeitos antinutricionais de taninos na alimentação animal (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO SEMIPURIFICADO DE TANASE.

3.1.1 Produção e pré-purificação

A produção da enzima tanase foi realizada conforme estudo de Battestin e Macedo (2007a) com modificações, utilizando o fungo *Paecilomyces variotii*, selecionado por Macedo, Matsuda e Battestin (2005). O micro-organismo foi cultivado em placas de petri com meio ágar batata-PDA (CM0139, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) contendo 0,5% (m/v) de ágar e 0,2% (m/v) de ácido tânico (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil) e incubado a 30°C por 72 horas em estufa Fanem (modelo 002/3, São Paulo, Brasil). O inóculo foi mantido sob refrigeração a 7°C até o momento do uso. A fermentação ocorreu em frasco de Erlenmeyer de 500 mL por meio de fermentação sólida, contendo 20 g de farelo de trigo (Natu's, Hortolândia, Brasil), 20 mL de água destilada e 10% de ácido tânico (m/m) (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil). O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e inoculado com suspensão de células de 9×10^6 células/mL. A suspensão de células foi produzida em homogeneizador do tipo Turrax (T 18 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, Alemanha) a partir da adição de 20 áreas circulares de $1,54 \text{ cm}^2$ ($d = 1,4 \text{ cm}$), retiradas da placa de PDA inoculada, em 200 mL de água destilada estéril, sendo a contagem dos esporos feita em Câmara de Neubauer. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C por 120 horas.

Após a fermentação, à extração das enzimas foi realizada com a adição de 160 mL de tampão acetato 20 mmol.L^{-1} pH 5,0 e agitação em agitador orbital (Fermentation Design Incorporated, Allentown, EUA) a 200 rpm por 1 hora. O extrato foi filtrado e então, centrifugado a $9630 \times g$ por 30 minutos a 4°C (Centrífuga Himac CR21GII, Hitachi, Tokyo, Japan). O sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo, Brasil) em concentração final de 80% de saturação (561 g/L) e mantido sob refrigeração por 12 horas. O precipitado formado foi recolhido por centrifugação a $9630 \times g$ por 30 minutos a 4°C e ressuspenso em água destilada para então, ser submetido à diálise

em tubo de membrana de celulose (D9527-100ft, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) por 48 horas em água destilada a fim de remover o excesso de sulfato de amônio. O extrato semipurificado obtido foi congelado a -18°C e liofilizado em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras Ind. Com. Serv. Liofilizadores Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) durante 24 horas. O extrato semipurificado liofilizado foi mantido a -18°C . A concentração de proteína total do extrato foi determinada segundo Bradford (1976) e o resultado expresso em mg de proteína/g enzima.

3.1.2 Determinação de atividade enzimática

3.1.2.1 *Tanase*

A determinação da atividade enzimática do extrato semipurificado de tanase foi realizada a partir da reação com o ácido tânico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) conforme o método de Sharma, Bhat e Dawra (2000) modificado. Soluções de ácido tânico ($200\text{ }\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4), de extrato semipurificado de tanase ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4) e tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4 foram previamente incubadas a 40°C por 5 minutos em banho termostatizado com agitação interna (modelo 500/1 DE, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil). Utilizando as soluções incubadas a 40°C , o teste foi preparado com $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução de ácido tânico e $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução do extrato semipurificado de tanase. Um branco foi preparado com $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução de ácido tânico e $250\text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4 e um controle foi preparado com $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução do extrato semipurificado de tanase e $250\text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4. O teste, o branco e o controle preparados foram incubados em banho a 40°C por 5 minutos e então, receberam respectivamente, com intervalo de 5 minutos entre cada reagente, $300\text{ }\mu\text{L}$ de solução de rodanina 0,665% em etanol (5-(4-dimetilaminobenzilideno)-rodanina 99%, Acros Organics, Belgica), $200\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de hidróxido de potássio $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ e 4 mL de água destilada. Após 10 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 520 nm (modelo DU[®]640, Beckman CoulterTM, EUA) sendo o valor da absorbância calculado por $\text{Abs}_{520} = (\text{A}_{\text{teste}} -$

($A_{\text{controle}} + A_{\text{branco}}$). A atividade enzimática foi avaliada por meio de uma curva de calibração de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4 e expressa como U/mg de proteína, considerando-se U como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido gálico por minuto sob as condições descritas.

3.1.2.2 *β-glicosidase*

A determinação da atividade de β-glicosidase do extrato semipurificado de tanase foi realizada utilizando o substrato cromogênico p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (p-NPG) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) conforme o método de Matsuura, Sasaki e Mura (1995) modificado. A reação consistiu de 300 μL de solução de p-NPG 5 mmol.L⁻¹ (em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4) e 300 μL da solução enzimática (15 μg/mL em água). Após incubação a 40°C por 30 minutos em banho termostatzado (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil), a reação foi paralisada com 300 μL de solução de carbonato de sódio 0,5 mol.L⁻¹ e as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm (modelo DU®640, Beckman Coulter™, EUA). A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração de p-nitrofenol (p-NP, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) em concentrações variando de 1 a 15 μg/mL em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4. A atividade de β-glicosidase foi expressa em U/mg de proteína, considerando-se U como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol p-NP por minuto sob as condições descritas.

3.2 ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO DO EXTRATO SEMIPURIFICADO DE TANASE

3.2.1 Substratos

Para avaliação da especificidade do extrato semipurificado de tanase foram testados como substratos os padrões Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha): ácido elágico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, resveratrol, quercetina, rutina, hesperetina, hesperidina e naringina.

3.2.2 Reação enzimática

A reação enzimática entre o extrato semipurificado de tanase e os substratos fenólicos foi realizada empregando-se 1 mL de uma solução de 10 mg/mL de substrato com 1 mL de uma solução 20 mg/mL do extrato enzimático, ambos em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4*. Como controle da reação, foi preparada uma solução de 5 mg/mL do padrão testado em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4. Como controle da enzima, foi preparada uma solução de 10 mg/mL do extrato semipurificado de tanase em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4. As amostras foram incubadas em banho termostatizado a 40°C (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil) durante 0, 30 e 60 minutos, sendo a reação paralisada em banho de gelo por 10 minutos. Neste trabalho, o padrão naringenina, aglicona do flavonoide naringina, foi obtido a partir da hidrólise completa da naringina pela enzima naringinase comercial de *Penicillium decumbens* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A reação foi realizada empregando-se 1 mL de uma solução de 10 mg/mL de naringina com 1 mL de uma solução 20 mg/mL de naringinase, ambos em tampão acetato 100 mmol.L⁻¹ pH 4,0. A amostra foi incubada em banho termostatizado a 40°C (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil) durante 0, 30 e 60 minutos e a reação paralisada em banho de gelo por 10 minutos.

3.2.3 Avaliação da reação enzimática

A análise dos produtos da reação enzimática entre os compostos fenólicos testados e o extrato semipurificado de tanase foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e por espectrometria de massas.

* Utilizou-se pH 7,4 e 40°C na reação como continuidade do trabalho de Macedo et al. (2011), que empregou as mesmas condições na hidrólise de epigallocatequina galato pelo extrato bruto de tanase de *P. variotti*.

3.2.3.1 Preparo das amostras

Para os padrões de ácido clorogênico e ácido ferúlico, 50 µL das amostras foram dissolvidos em 950 µL de água Milli-Q e então filtrados em filtros Millipore 0,45 µm. Para os demais padrões, 50 µL das amostras foram dissolvidas em 600 µL de metanol e 350 µL de água Milli-Q e então filtrados em filtros Millipore 0,45 µm. Nas análises de espectrometria de massas, 50 µL de todas as amostras foram previamente diluídos em 500 µL de metanol e 450 µL de água Milli-Q.

3.2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em um equipamento Dionex UltiMate 3000 (Alemanha) equipado com amostrador automático (WPS-3000(T)SL Analytical), bomba quaternária (LPG-3400SD) e detector de arranjo de diodos UV/VIS (DAD-3000). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna C18 Atlantis® (Waters, 5 µm, 4,6 x 150 mm). O método utilizado foi adaptado de Caridi et al. (2007) e de Mejía et al. (2010). As análises tiveram como fase móvel solvente A (água/ácido fórmico, 99.9:0.1 v/v) e solvente B (metanol/ácido fórmico, 99.9:0.1 v/v). A eluição dos padrões ocorreu conforme o seguinte gradiente: 10% B por 5 minutos, de 10-80% B em 35 minutos, de 80-10% B em 5 minutos e 10% B por 5 minutos, com vazão de 0.6 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a coluna mantida em temperatura de 30°C. Os espectros foram adquiridos entre 190 e 480 nm e os cromatogramas processados a 260, 280 e 330 nm.

3.2.3.3 Espectrometria de massas

A caracterização das amostras foi realizada por espectrometria de massas em parceria com o laboratório ThoMSon da Unicamp utilizando o método ESI-MS (electrospray ionization) em um equipamento Q-TOF (Synapt G1, Waters, Manchester, UK) no modo negativo. As condições gerais foram: temperatura da fonte de 100°C, tensão

capilar de 3 kV e tensão de cone de 30 V. Para medições no modo negativo, 50 μ L das amostras previamente diluídas, foram dissolvidos em 950 μ L de solução água/metanol (1:1 v/v) com 0,1% de hidróxido de amônio. A infusão das amostras foi realizada por injeção direta com uma vazão de 20 μ L/min. Os espectros de massa foram adquiridos durante 60 segundos na faixa de relação massa/carga (m/z) entre 50 e 1000.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* utilizado nos ensaios foi primeiramente caracterizado quanto o seu teor de proteínas totais, sua atividade de tanase e atividade específica nas condições empregadas no estudo (pH 7,4 e 40°C). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Medida da atividade enzimática específica de tanase do extrato enzimático semipurificado de *Paecilomyces variotii*.

Atividade de Tanase	Atividade (U* / g enzima)	Proteínas totais (mg proteína / g enzima)	Atividade específica (U* / mg proteína)
Extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i>	93,94	318,34	0,295

* 1U de atividade enzimática foi definida como a quantidade em μmol de ácido gálico formado por minuto de reação.

Conforme observado na Tabela 3, para cada ensaio de hidrólise enzimática dos padrões fenólicos onde foi utilizada uma solução de extrato semipurificado de tanase de 20 mg/mL, levando-se em consideração a atividade específica, foi adicionado de tanase 1,88 U/mL de reação.

Com o objetivo de avaliar se o extrato semipurificado de tanase sofria alguma alteração durante as condições de análise que pudesse comprometer os cromatogramas obtidos nas reações dos polifenóis, o controle da enzima foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e os cromatogramas processados a 260, 280 e 330 nm (Anexo A). Conforme o esperado, os cromatogramas do controle da enzima apresentaram baixa intensidade dos sinais e pouca alteração no perfil cromatográfico entre os tempos 0, 30 e 60 minutos de reação, indicando que simplesmente a presença da tanase no meio reacional não seria capaz de gerar qualquer modificação significativa no perfil dos polifenóis reagidos.

Representantes de diferentes classes de polifenóis foram utilizados como substrato para a enzima, sendo esses, os ácidos fenólicos: elágico, ferúlico e clorogênico; o

resveratrol da classe de estilbenos; os flavonóis: rutina e quercetina; e as flavanonas: naringina, hesperidina e hesperetina. Estes padrões polifenólicos foram primeiramente caracterizados por CLAE-DAD para definição do tempo de retenção e perfil de absorção de cada composto nas condições de análise (Anexo C, D, E e F) sendo os cromatogramas representados no comprimento de onda mais adequado ao espectro de absorção do composto dentre os utilizados na aquisição dos dados (260, 280 e 330 nm).

A ação do extrato semipurificado de tanase nos diferentes substratos polifenólicos foi avaliada comparando-se os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos substratos com reação enzimática com os mesmos substratos sem reação, nos tempos 0, 30 e 60 minutos. Para todos os polifenóis avaliados sem reação com o extrato semipurificado de tanase (Anexo G a Anexo O), os cromatogramas não apresentaram diferença com o decorrer do tempo de reação, logo não sofreram degradação espontânea devido às condições de análises. Já os resultados obtidos para os polifenóis que sofreram reação com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* estão descritos a seguir e foram separados conforme sua classificação em ácidos fenólicos, estilbenos e flavonoides.

4.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

O ácido elágico é um derivado dimérico do ácido gálico obtido a partir da hidrólise de elagitaninos e uma lactonização* espontânea dos resíduos de ácido hexahidroxi difênico para uma forma mais estável (MINGSHU et al., 2006). A Figura 6 ilustra a formação de ácido elágico a partir da hidrólise de um elagitanino.

* Uma lactona é o produto de condensação de um grupo funcional álcool e um grupo ácido carboxílico na mesma molécula (um hidroxíácido).

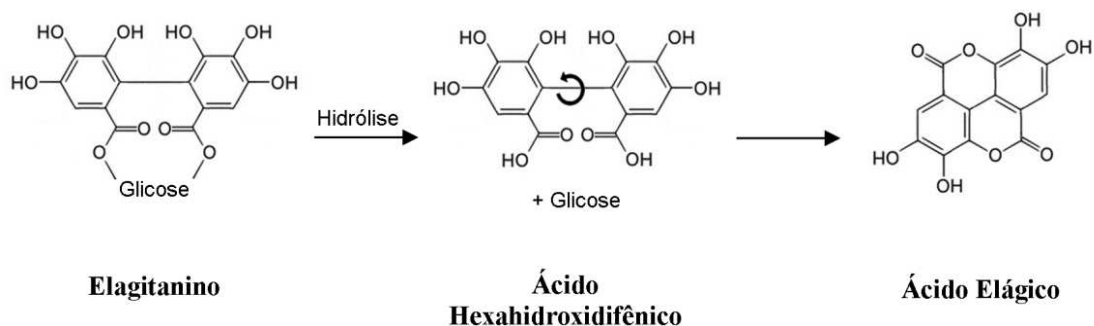


Figura 6: Hidrólise de elagitaninos produzindo ácido hexahidroxidifênico espontaneamente lactonizado para ácido elágico.
 Fonte: Adaptado de Häkkinen et al. (2000).

A reação do ácido elágico (ácido 4,4',5,5',6,6'-hexahidroxidifênico-2,6,2',6'-dilactona) com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* buscava observar se haveria a liberação de moléculas de ácido gálico como resultado da hidrólise. Isso significaria que a tanase testada foi capaz de atuar na ligação C-C entre os resíduos de ácido gálico que formam essa molécula. A Figura 7 apresenta os cromatogramas obtidos da reação do ácido elágico com o extrato semipurificado de tanase nos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação.

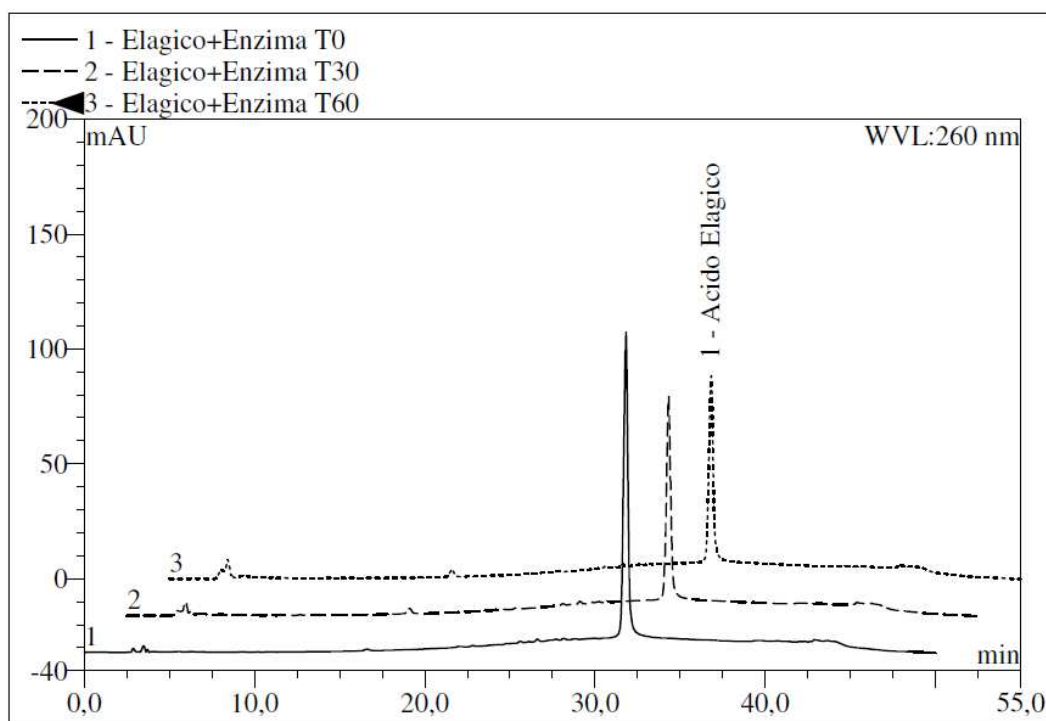


Figura 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação do ácido elágico com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.

Dentro dos limites de detecção da análise, os cromatogramas obtidos na Figura 7 não apresentaram a formação de outros compostos com o decorrer do tempo de reação e, portanto o meio reacional não possui outro composto além do ácido elágico. O que pode ser observado, tanto para o ácido elágico reagido com tanase (Figura 7) quanto para o ácido elágico puro (Anexo G), é que houve um decréscimo da intensidade dos picos do ácido elágico nos tempos 30 e 60 minutos de reação quando comparados com o tempo zero, o que pode ser justificado por certo grau de insolubilidade do ácido elágico nas condições da reação e, portanto dificuldade em manter a homogeneidade no preparo da amostra para injeção. Conforme o esperado, nas condições testadas, o extrato enzimático de tanase não foi capaz de atuar na ligação C-C entre as moléculas de ácido gálico que compõe a estrutura do ácido elágico, o que seria equivalente à hidrólise de taninos condensados por essa enzima, fato nunca observado antes na literatura.

O ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) consiste de um derivado éster do ácido cafeico com uma molécula de ácido quínico (MANACH et al., 2004; HUANG; CAI; ZHANG, 2010). Neste estudo, o ácido clorogênico também foi avaliado como substrato para o extrato semipurificado de tanase. Os cromatogramas obtidos encontram-se na Figura 8.

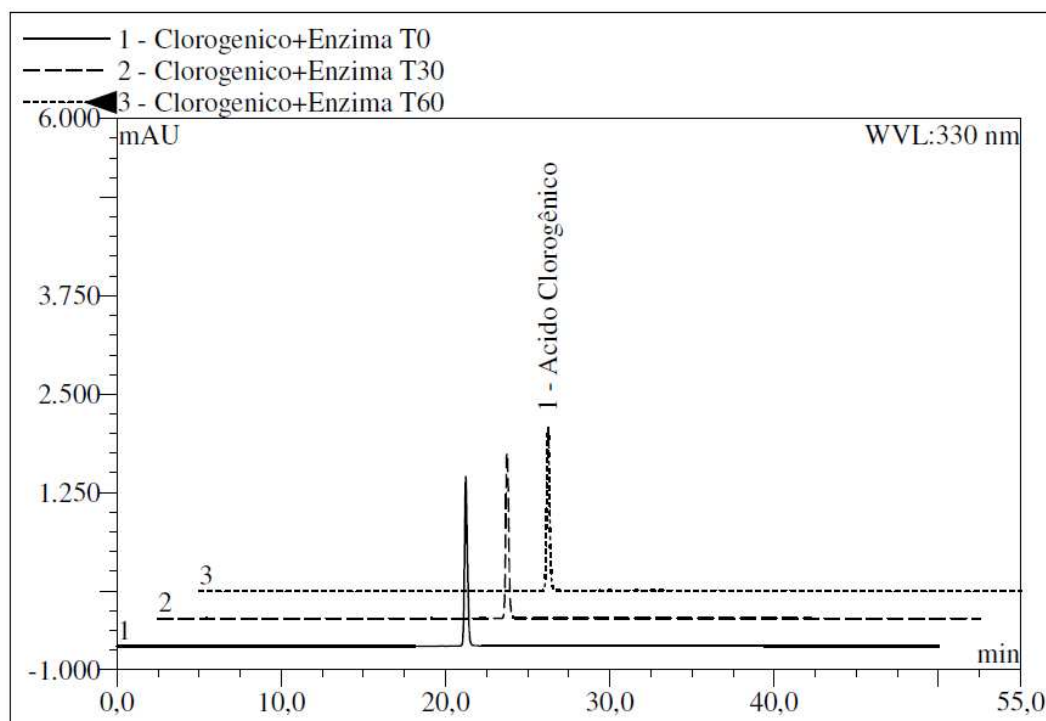


Figura 8: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do ácido clorogênico com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.

Conforme observado na Figura 8, os cromatogramas correspondentes aos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação são semelhantes e não apresentaram nenhum pico além do ácido clorogênico que poderia caracterizar a formação de um produto da reação. Entretanto, alguns trabalhos observaram a formação de ácido cafeico e ácido quínico a partir da hidrólise de ácido clorogênico pela ação de uma tanase (DYCKERHOFF, 1937; LEKHA; LONSANE, 1997; NIEHAUS; GROSS, 1997; YAO et al., 2011). Segundo Lekha e Lonsane (1997), a tanase hidrolisa substratos com ao menos dois grupos hidroxilas no

componente ácido e apesar do ácido clorogênico possuir esses dois grupos hidroxilas, ele seria resistente à hidrólise devido à presença de uma dupla ligação na cadeia lateral da molécula. De acordo com o exposto, apesar de outros estudos apontarem a hidrólise desse substrato por tanase, nesse trabalho o ácido clorogênico apresentou resistência à hidrólise pelo extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*. Em outro estudo onde se obteve o mesmo resultado, Curiel et al. (2009) expressaram o gene de codificação da tanase de *Lactobacillus plantarum* em *Escherichia coli* e, posteriormente, a tanase recombinante foi purificada, caracterizada e quando teve sua atividade avaliada frente a diferentes substratos, também não foi capaz de hidrolisar o ácido clorogênico.

O ácido ferúlico é encontrado principalmente ligado à hemicelulose da parede celular das fontes vegetais por meio de ligações éster (YANG et al., 2001). Alguns estudos tem mostrado um potencial da tanase na hidrólise dessas ligações e consequentemente na obtenção de ácido ferúlico livre. García-Conesa et al. (2001) avaliaram a atividade de tanase de *Aspergillus oryzae* em derivados hidroxicinâmicos e observaram a capacidade da enzima em hidrolisar diferentes diferulatos de etila sintéticos. Yao et al. (2011) empregaram uma tanase recombinante obtida de uma biblioteca de metagenômica na hidrólise de diferentes substratos e observaram a capacidade desta em hidrolisar ferulato de etila, além de ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido tânico, epicatequina galato e epigallocatequina galato. No presente estudo o ácido ferúlico (ácido *trans*-4-hidroxi-3-metoxicinnamico) foi avaliado na sua forma livre e, portanto qualquer atividade hidrolítica da tanase sobre esse composto seria pouco provável, visto que sua estrutura química não apresenta nenhuma ligação tipo éster ou depsídica. A Figura 9 representa a reação do ácido ferúlico com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

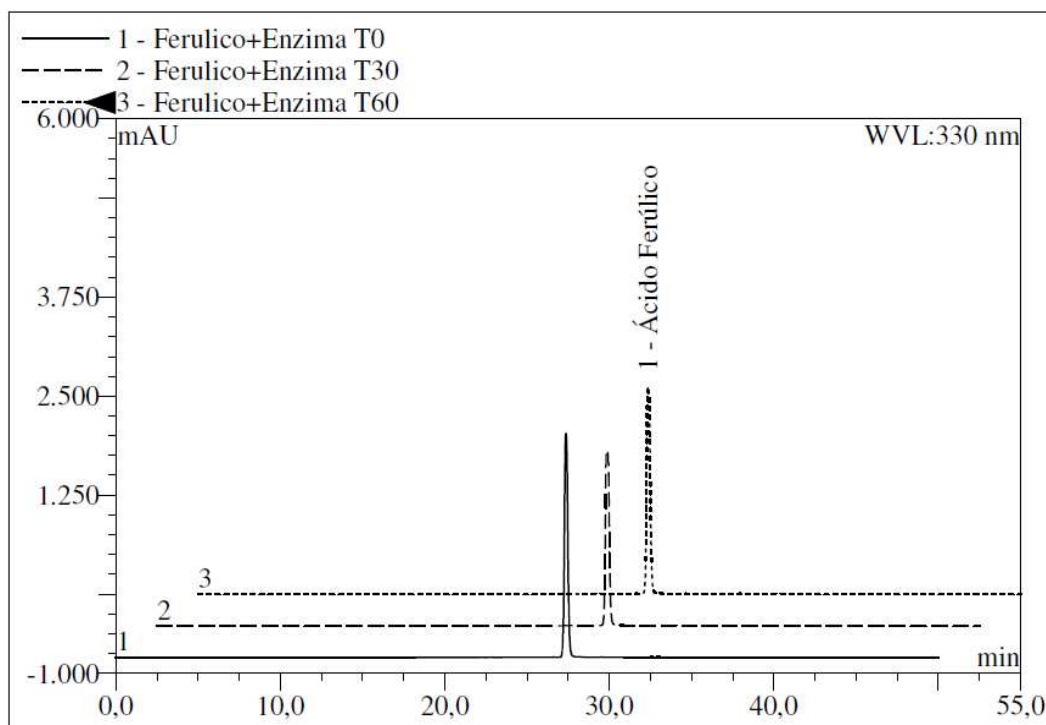


Figura 9: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do ácido ferúlico com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.

Conforme o esperado, os cromatogramas nos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação não apresentaram nenhum pico além daquele correspondente ao próprio ácido ferúlico e, portanto não há indícios da ocorrência de hidrólise do substrato. Assim, nas condições de reação testadas, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* não foi capaz de atuar sobre nenhum ácido fenólico estudado.

4.2 ESTILBENOS

O resveratrol está relacionado com o potencial antioxidante do vinho tinto e com a prevenção de doenças cardiovasculares e pode ser encontrado na forma dos isômeros *cis* e *trans* e também em seus derivados β -glicosídicos (LA TORRE et al. 2004). A Figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos da reação nos tempos 0, 30 e 60 minutos do resveratrol (*trans*-resveratrol) com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

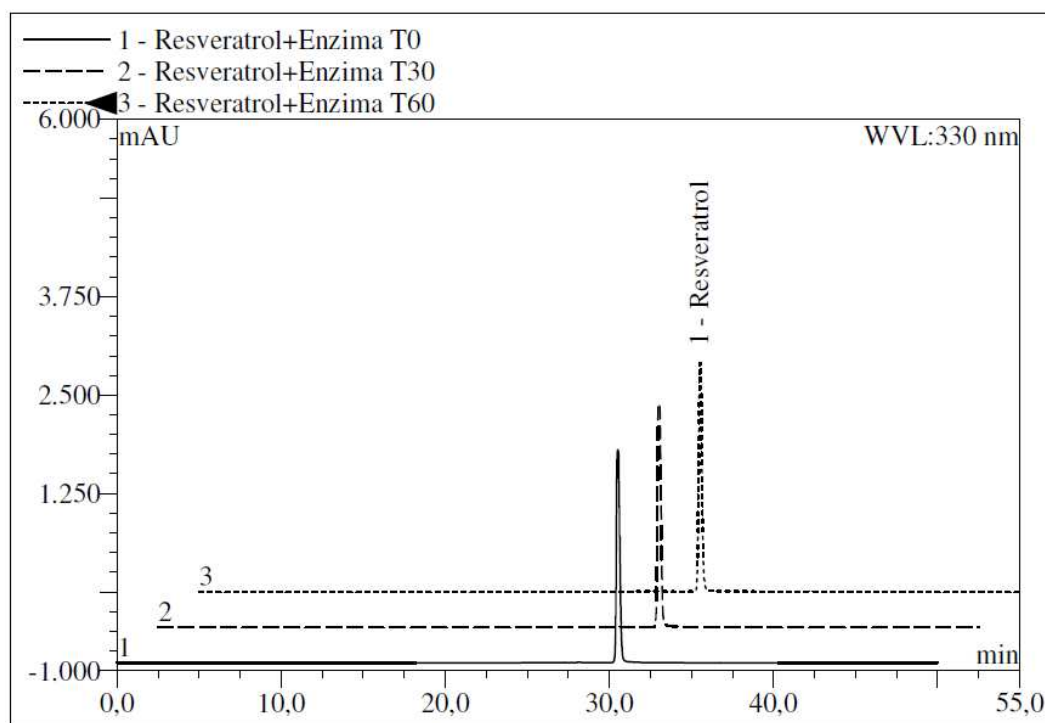


Figura 10: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do resveratrol com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.

A ausência de um pico além daquele referente ao resveratrol nos cromatogramas da Figura 10 indica que o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* não foi capaz de hidrolisar esse substrato. Devido à ausência de uma ligação éster ou depsídica na estrutura do resveratrol, uma hidrólise dessa molécula por uma tanase seria muito improvável, entretanto, as condições de reação empregadas poderiam provocar a conversão de parte do isômero *trans*-resveratrol para *cis*. Estudos mostram que quando o *trans*-resveratrol em solução recebe radiação ultravioleta (UV) ele pode sofrer uma conversão parcial para o seu isômero *cis*-resveratrol, resultando numa mistura de *trans* e *cis*-resveratrol (JEANDET et al., 1995). O isômero *cis*-resveratrol não é tão biologicamente ativo quanto o isômero *trans* o que indica que a diferença no comportamento molecular dos dois isômeros é dependente da estrutura molecular tridimensional (CARUSO et al., 2004). La Torre et al. (2004) avaliaram a concentração dos isômeros *cis* e *trans*-resveratrol em amostras de vinho por CLAE-DAD também utilizando

uma coluna C18. Os picos foram identificados por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção com padrões de soluções de *cis* e *trans*-resveratrol, sendo os comprimentos de onda de máxima absorção dos isômeros de 285 e 307 nm, respectivamente. Nas condições de análise empregadas neste trabalho, os cromatogramas obtidos tanto para o resveratrol sem reação enzimática (Anexo R) como para o resveratrol reagido com extrato semipurificado de tanase (Anexo S) não apresentaram outro pico que pudesse caracterizar a formação do isômero *cis*-resveratrol em decorrência da incidência de radiação UV e, além disso, os espectros de absorção apresentaram máximo de absorção em 307 nm e não sofreram alterações significativas com o decorrer do tempo, indicando que o substrato não sofreu isomerização nas condições de reação.

4.3 FLAVONOIDES

Os flavonoides são amplamente distribuídos nas plantas e já tiveram mais de 4.000 compostos identificados (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA; 2002). No entanto, do que se tem conhecimento, dentre as classes de flavonoides existentes, apenas os flavanóis epicatequina galato e epigallocatequina galato foram avaliados como substrato para a tanase (LEKHA; LONSANE, 1997; LU; CHEN, 2008; YAO et al., 2011). A seguir, são apresentados os resultados obtidos com outras classes de flavonoides empregadas como substrato para a tanase: os flavonóis e as flavanonas.

4.3.1 Flavonóis

Os flavonóis avaliados como substratos para a tanase de *Paecilomyces variotii* foram a quercetina e seu glicosídeo rutina. A atuação da tanase de *P. variotii* na aglicona quercetina (3,3',4',5,7- pentahidroxiflavona) está apresentada na Figura 11.

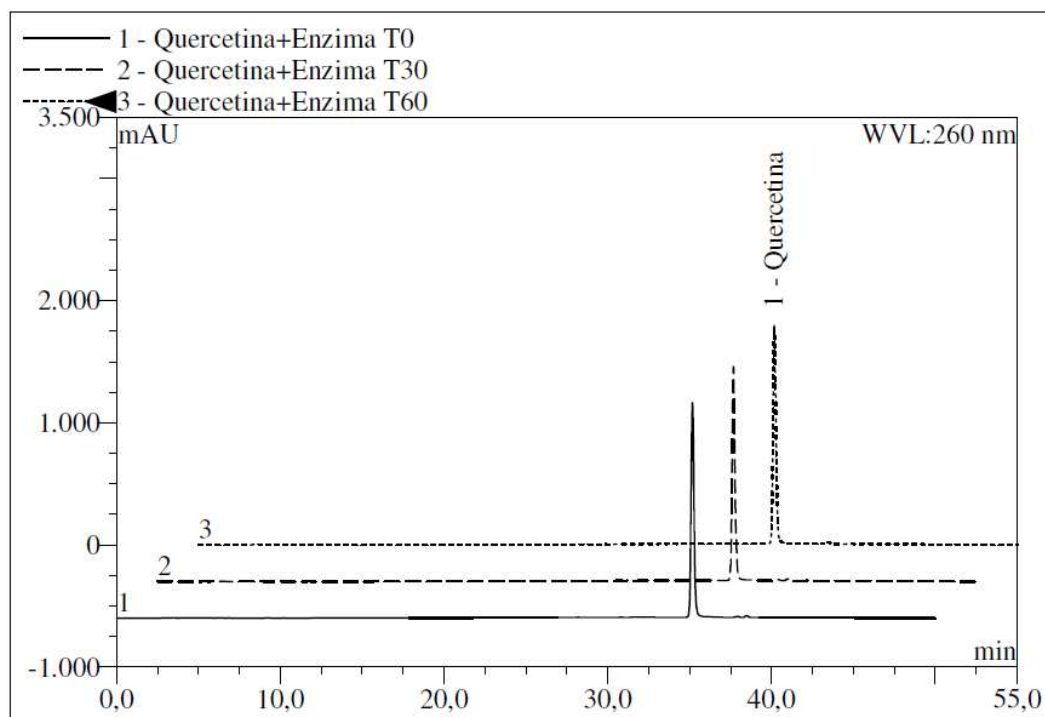


Figura 11: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação da quercetina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.

Conforme observado na Figura 11, os cromatogramas obtidos para a quercetina nos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação não apresentaram outros picos além do pico referente à quercetina e, portanto este composto não sofreu hidrólise pelo extrato semipurificado de tanase. Segundo Popova e Tikotskaya (1971), a hidrólise alcalina da quercetina forma os compostos ácido protocatecóico e floroglucina (Figura 12).

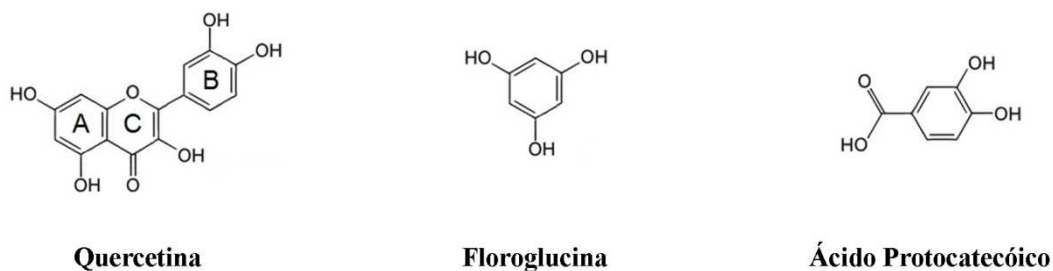


Figura 12: Estrutura química da quercetina (representada com a denominação dos anéis) e dos produtos de sua hidrólise alcalina, floroglucina e ácido protocatecóico.

Estudos com hidrólise enzimática de quercetina mostram que a enzima quercetinase* (quercetina 2,3-dioxigenase, EC 1.13.11.24) é capaz de hidrolisar a quercetina em monóxido de carbono e um depsídeo (TRANCHIMAND et al., 2008; TRANCHIMAND; BROUANT; IACAZIO, 2010) (Figura 13). A produção destes compostos pela atuação de uma tanase na quercetina seria pouco provável, visto que, seria necessário o rompimento do heterociclo oxigenado (anel C) da quercetina, e esse tipo de ação não é característico de uma tanase.

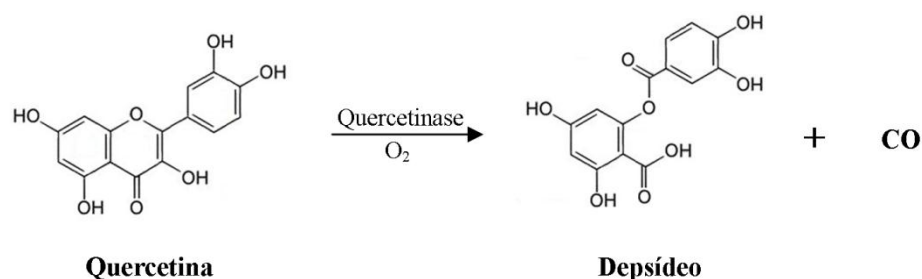


Figura 13: Hidrólise da quercetina por uma quercetinase produzindo monóxido de carbono (CO) e um depsídeo.

Fonte: Tranchimand, Brouant e Iacazio (2010).

A Figura 14 apresenta os cromatogramas no tempo 0, 30 e 60 minutos de reação da rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*. Diferentemente do observado nas reações anteriores, a partir do tempo de 30 minutos de reação o cromatograma apresenta um pico adicional ao referente à rutina. Além disso, o pico formado teve sua área aumentada com o decorrer do tempo de reação, indicando que a reação continua em andamento. A rutina consiste de uma quercetina ligada na posição C3 a um dissacarídeo (rutinose, 6-O- α -L-ramnosil-D-glicose) e uma possível hidrólise deste composto poderia levar a formação da aglicona quercetina.

* A quercetinase é uma enzima produzida principalmente por fungos e induzida pela presença de kaempferol, rutina e quercetina (TRANCHIMAND; BROUANT; IACAZIO, 2010).

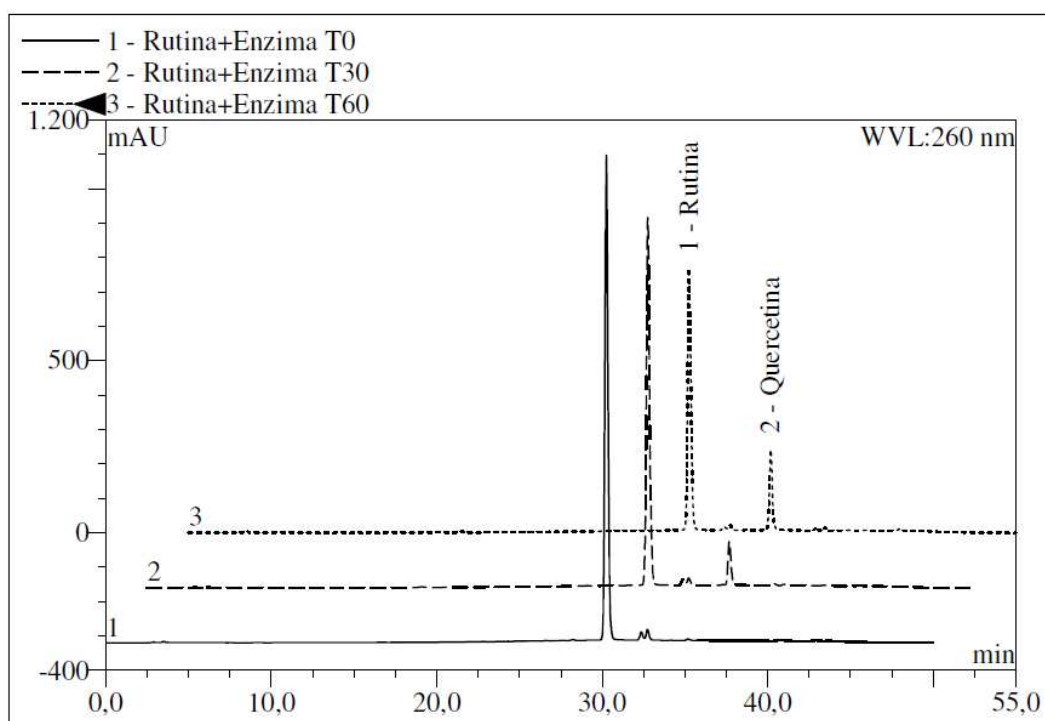


Figura 14: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação da rutina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando a formação de quercetina como produto da reação com o decorrer do tempo.

Para a identificação do pico adicional observado nos cromatogramas da Figura 14 comparou-se o tempo de retenção e o espectro de absorção desse composto, com o pico da quercetina nas mesmas condições de reação. A Figura 15 apresenta o cromatograma da reação da rutina com a tanase de *P. variotii* no tempo 60 minutos e cada pico representado está identificado com seu tempo de retenção e seu espectro de absorção.

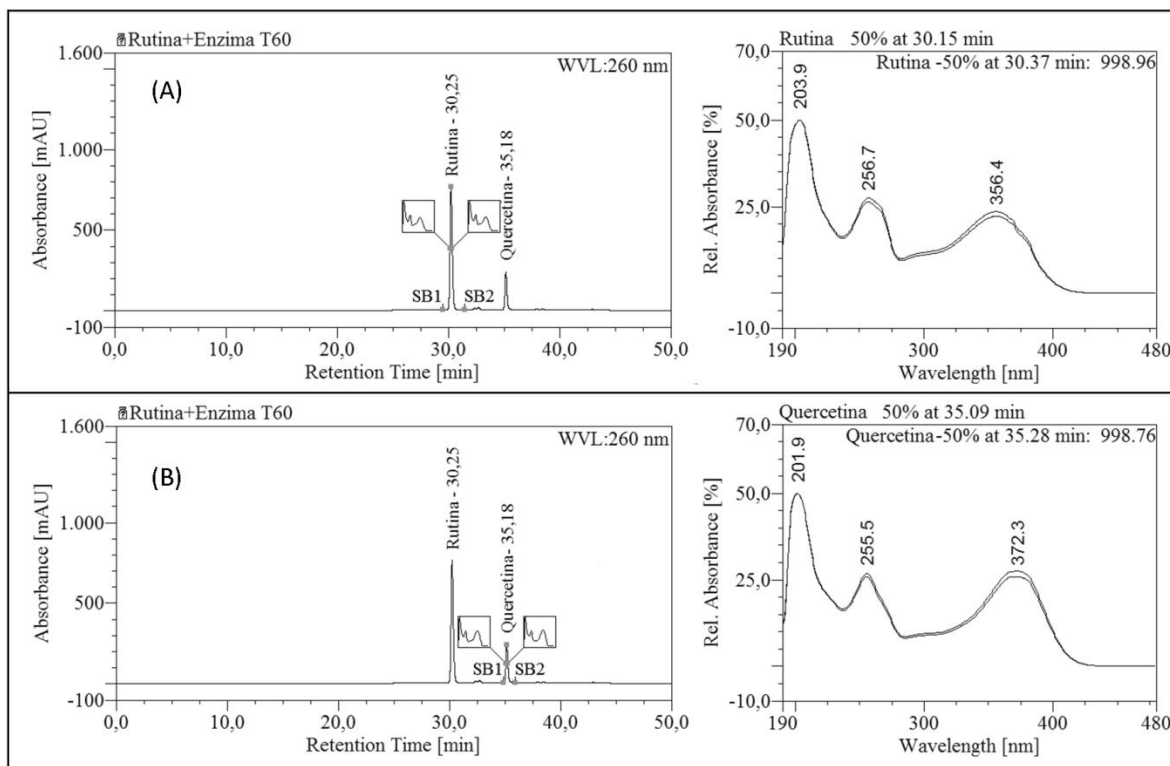


Figura 15: Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 260 nm da reação da rutina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos com (A) destaque para o espectro de absorção da rutina e (B) destaque para o espectro de absorção do produto da reação.

Comparando-se o cromatograma da quercetina (Anexo E, Figura A) com o pico do produto da reação da rutina (Figura 15B) pode-se verificar que ambos apresentaram tempo de retenção de 35,1 minutos e pontos de máxima absorção no espectro muito semelhantes, fornecendo forte indício de que a quercetina é o produto gerado da reação da rutina com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

A mesma reação ainda foi avaliada em espectrofotômetro de massas a fim de confirmar a identidade do produto obtido. Para isso, comparou-se a relação massa/carga (m/z) do produto formado na reação com a m/z da quercetina nas mesmas condições. Os espectros de massas obtidos para a rutina, para a rutina reagida com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e para a quercetina estão apresentados na Figura 16, respectivamente pela denominação A, B e C.

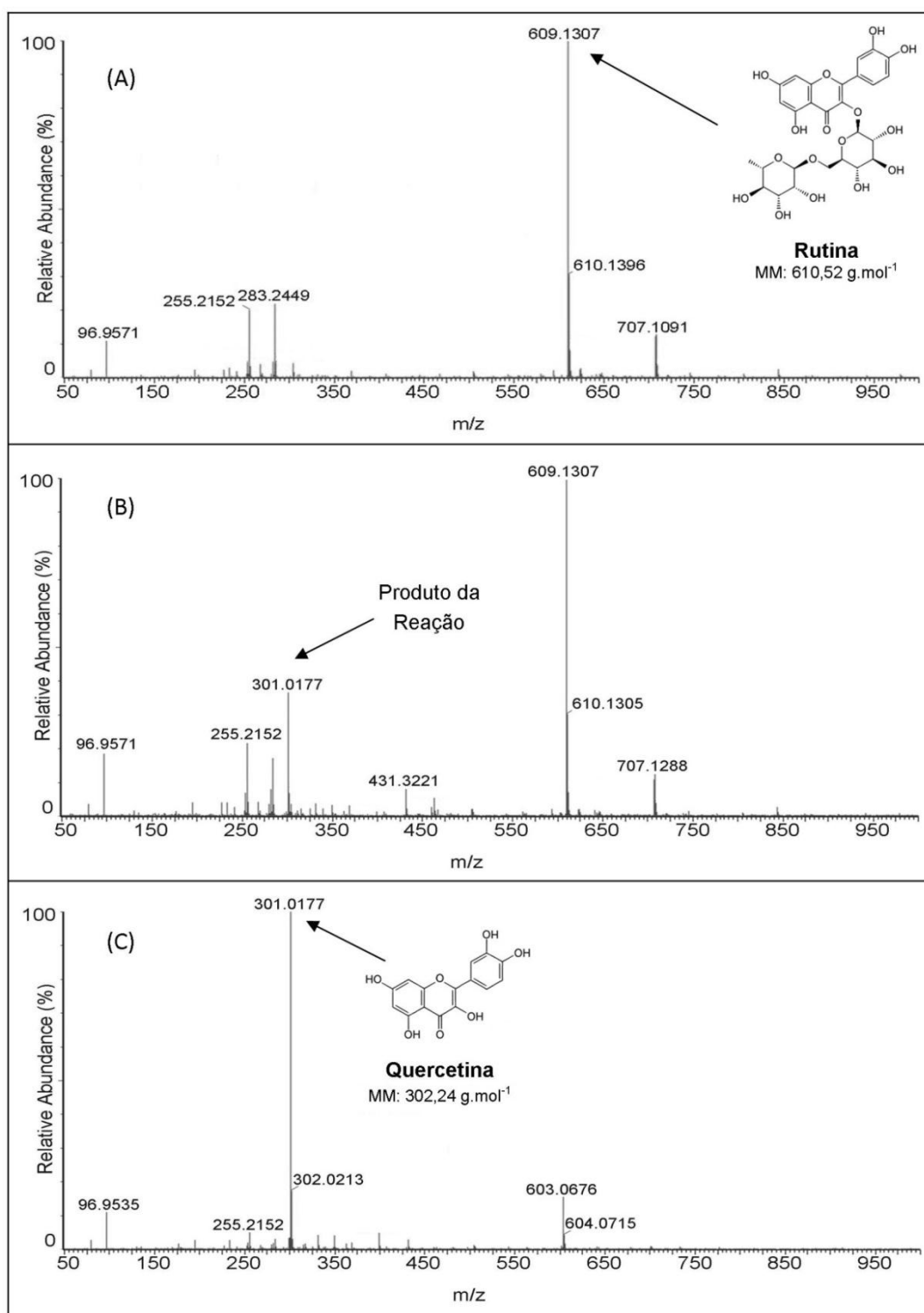


Figura 16: Espectro de massas da reação a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos de (A) rutina, (B) rutina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e (C) quercetina, indicando a formação de quercetina como produto da reação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* com rutina.

Avaliando os espectros de massas representados na Figura 16 pode-se confirmar a obtenção de quercetina como produto de reação da rutina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*. O espectro de massas obtido para a rutina reagida com o extrato semipurificado de tanase (Figura 16B) apresenta o aparecimento do composto com m/z de 301.01, que coincide com a m/z da quercetina nas mesmas condições (Figura 16C). Nenhum composto com a mesma m/z aparece no espectro de massas da rutina sem reação (Figura 16A) e nos espectros de massas do tampão e do controle da enzima (Anexo B). Assim, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* foi capaz de hidrolisar a rutina com a formação de quercetina como produto da reação.

Pelo que se tem conhecimento, nenhum trabalho até hoje avaliou a atuação de uma enzima tanase na hidrólise de rutina para a obtenção de quercetina. Estudos têm mostrado que a rutina pode ser hidrolisada por duas vias, a primeira utiliza uma α -ramnosidase e uma β -glicosidase com a formação do intermediário isoquercitrina (quercetina 3-O- β -glicosídeo) e a segunda ocorre em uma única etapa e utiliza apenas a enzima β -rutinosidase formando diretamente quercetina (Figura 17) (NAM et al., 2011).

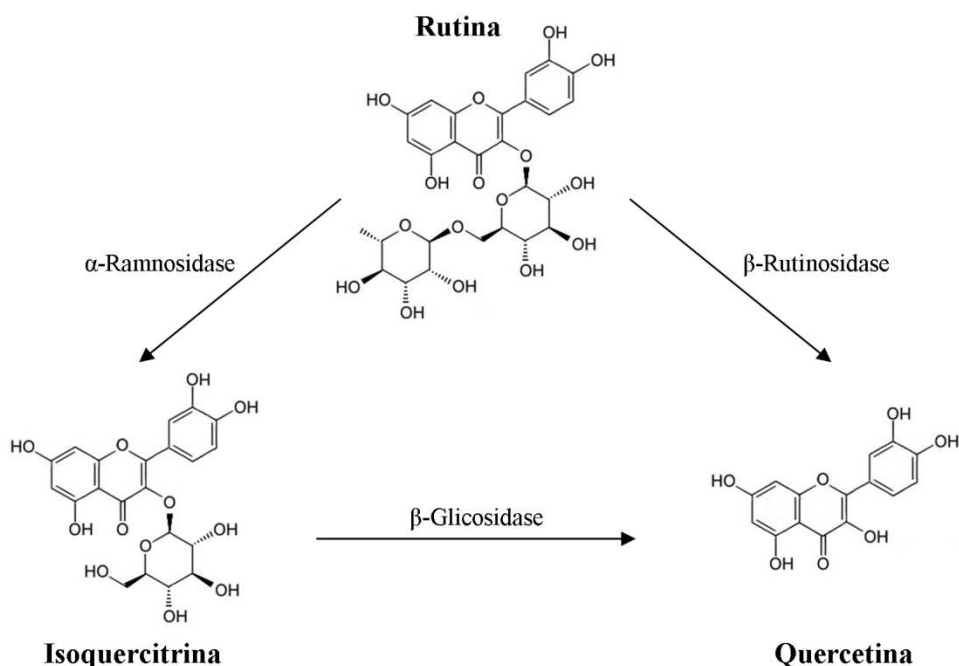


Figura 17: Via hidrolítica da rutina a quercetina por duas enzimas (α -ramnosidase e β -glicosidase) através da isoquercitrina e por uma única enzima, a β -rutinosidase.

Fonte: Adaptado de Nam et al. (2011).

Narikawa et al. (2000) produziram e purificaram uma rutinosidase de *Penicillium rugulosum* com pH ótimo 2,0 e uma temperatura ótima de 50°C, induzida pela presença de rutina no meio de cultivo. A rutinosidase atuou apenas nos substratos rutina e isoquercitrina, enquanto que a quercitrina (quercetina 3-O- α -ramnosídeo), hesperidina e naringina não foram utilizadas como substrato, assim como p-nitrofenil- β -glicosídeo, metil glicosídeo e celobiose. Esse resultado mostrou que a rutinosidase é uma enzima bastante específica e discrimina no substrato tanto a parte do açúcar quanto a parte da aglicona do flavonol (TRANCHIMAND; BROUANT; IACAZIO, 2010).

Devido à ausência de picos adicionais aos picos referentes à rutina e quercetina nos cromatogramas da Figura 14 que pudessem indicar a formação de um intermediário da reação, assim como, à ausência de compostos com massa molecular semelhante ao da isoquercitrina (± 464 g/mol) no espectro de massas da Figura 16B, a hidrólise da rutina pelo extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* pareceu ocorrer em uma única etapa. Assim como na hidrólise da rutina por β -rutinosidase (Figura 17), o extrato de tanase pareceu atuar diretamente na ligação glicosídica entre o dissacarídeo rutinose e carbono C3 da aglicona quercetina, sem a formação de intermediários. A Figura 18 apresenta uma indicação da atuação do extrato semipurificado de tanase em rutina.

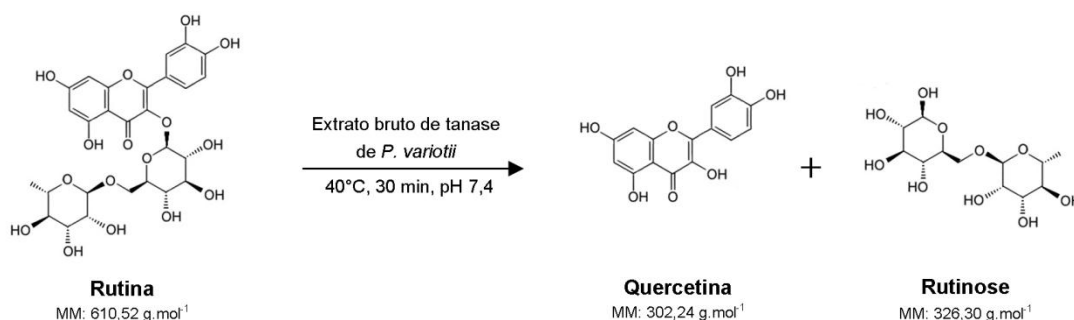


Figura 18: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* em rutina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.

Apesar desse tipo de ligação não ser comum para a atuação de uma tanase, essa não é a primeira vez que essa enzima é observada na hidrólise de ligações glicosídicas. Ramírez-Coronel et al. (2003) avaliaram a especificidade de tanase purificada obtida de

Aspergillus niger frente a diferentes substratos e observaram que a enzima foi capaz de romper a ligação β -1,4 do dissacarídeo celobiose, mas em presença de ácido tânico, nenhuma atividade β -glicosídica foi detectada.

4.3.2 Flavanonas

As flavanonas avaliadas como substrato para a tanase de *Paecilomyces variotii* foram a hesperetina, hesperidina e naringina. A atuação da tanase de *P. variotii* na aglicona hesperetina está apresentada na Figura 19.

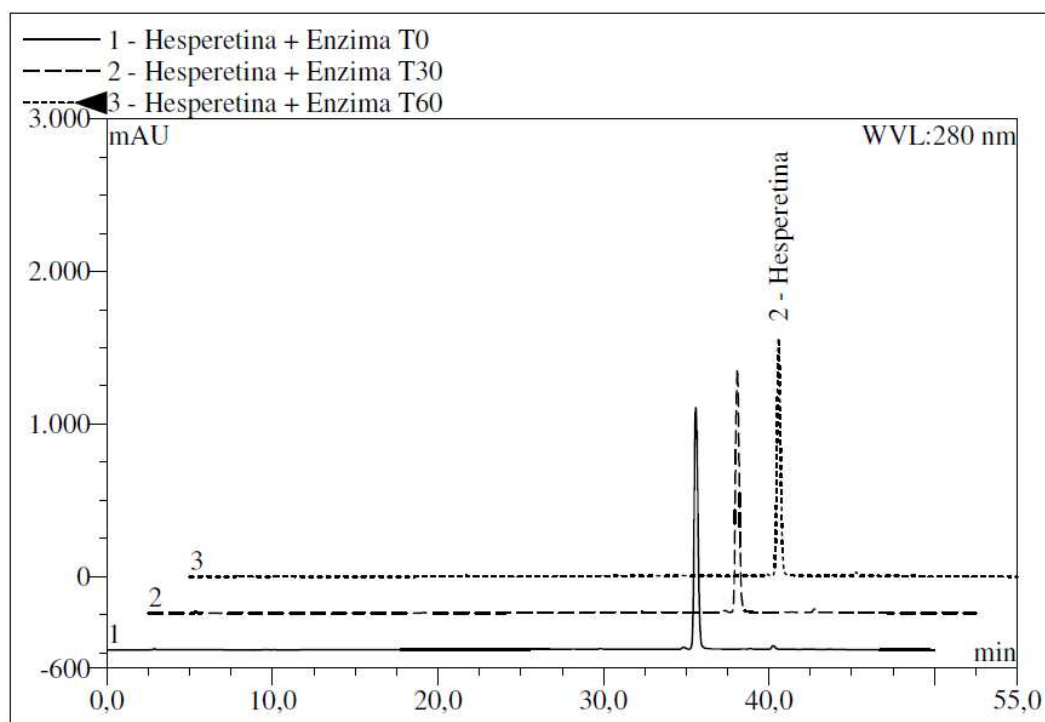


Figura 19: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da hesperetina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando ausência de produtos de reação com o decorrer do tempo.

Conforme observado na Figura 19, os cromatogramas nos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação não apresentaram outros picos além do pico referente à hesperetina e, portanto este composto não sofreu hidrólise pelo extrato semipurificado de tanase. Não foi

encontrado nenhum estudo que demonstrasse a hidrólise enzimática de hesperetina, no entanto, segundo Perkin (1898), a hidrólise alcalina desse composto deu origem a floroglucina e ácido isoferúlico (Figura 20). Assim, como o observado para a quercetina, seria pouco provável a hidrólise da hesperetina por atuação de uma tanase, visto que, também seria necessário o rompimento do heterociclo oxigenado (anel C) da hesperetina, e esse tipo de ação não é característico de uma tanase.

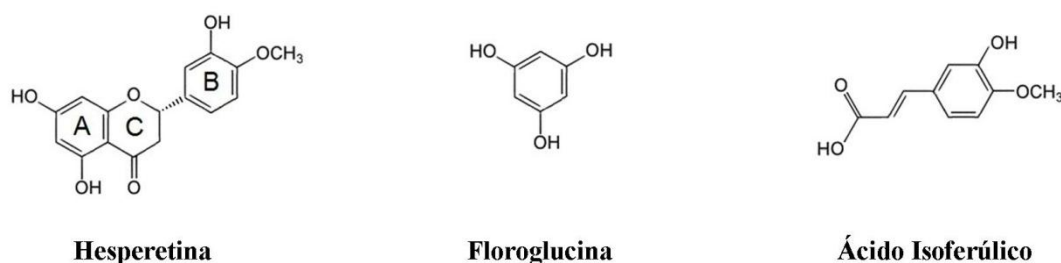


Figura 20: Estrutura química da hesperetina (representada com a denominação dos anéis) e dos produtos de sua hidrólise alcalina, floroglucina e ácido isoferúlico.

A Figura 21 apresenta os cromatogramas obtidos da reação da hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosídeo) com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

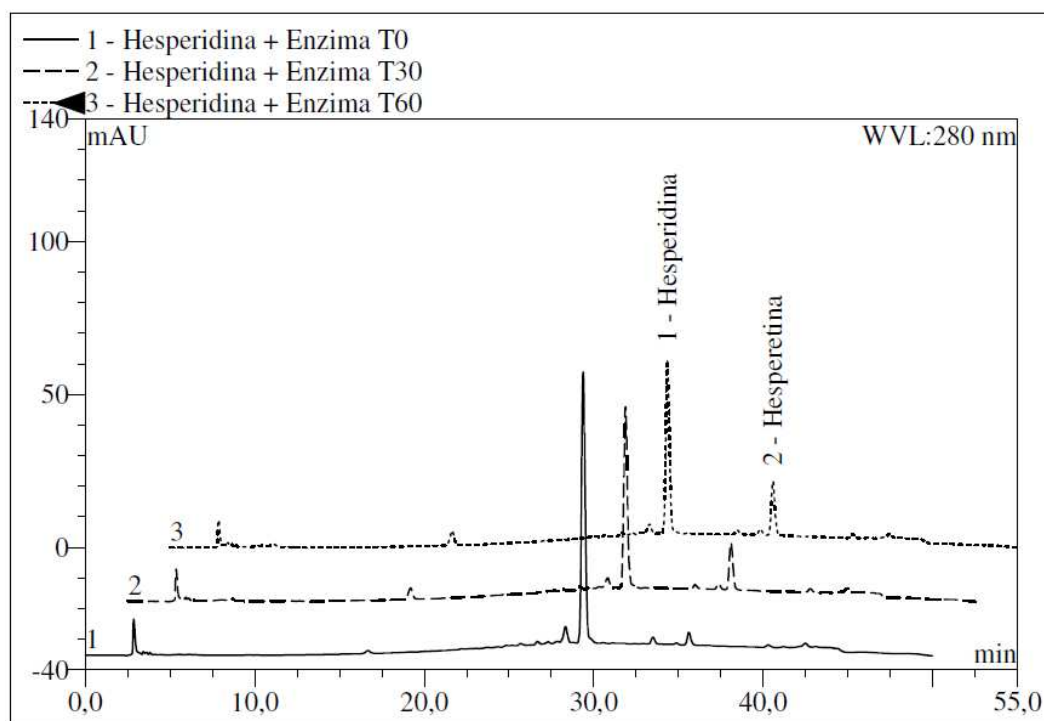


Figura 21: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da hesperidina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando a formação de hesperetina como produto da reação com o decorrer do tempo.

Através dos cromatogramas obtidos na Figura 21, assim como o ocorrido com a rutina, observa-se o aumento de um pico diferente do pico referente à hesperidina a partir de 30 minutos de reação. A hesperidina consiste de uma molécula de hesperetina ligada na posição C7 por um dissacarídeo (rutinose, 6-O- α -L-ramnosil-D-glicose) e uma possível hidrólise deste composto poderia levar a formação da aglicona hesperetina.

Para a identificação do pico adicional foi necessário comparar o tempo de retenção e o espectro de absorção desse composto, com o pico da hesperetina nas mesmas condições de reação (Anexo F, Figura A). A Figura 22 apresenta o cromatograma da reação da hesperidina com a tanase de *P. variotii* no tempo 60 minutos e cada pico representado está identificado com seu tempo de retenção e seu espectro de absorção.

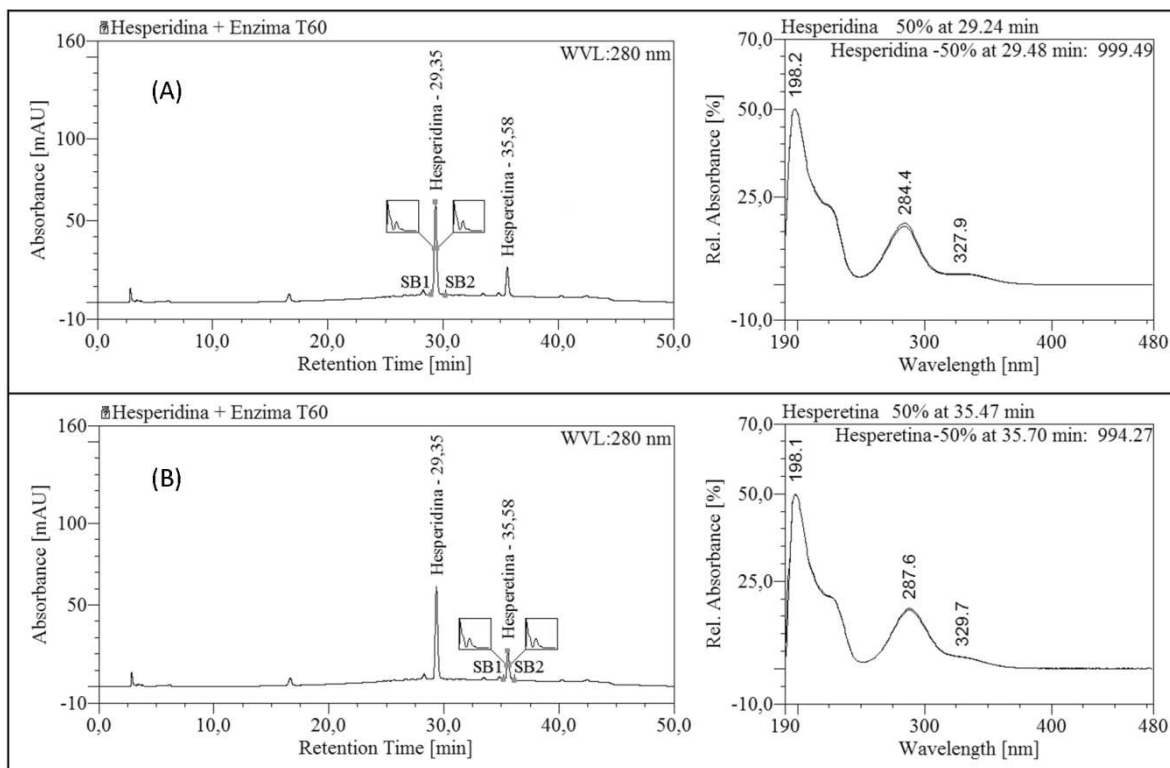


Figura 22: Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 280 nm da reação de hesperidina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos com (A) destaque para o espectro de absorção da hesperidina e (B) destaque para o espectro de absorção do produto da reação.

Conforme observado na Figura 22B, o produto da reação da hesperidina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* apresenta tempo de retenção de 35,6 minutos assim como o observado para a hesperetina nas mesmas condições de reação (Anexo F, Figura A). Além disso, os pontos de máxima absorção nos espectros do produto formado e da hesperetina são muito semelhantes, fornecendo forte indício de que a hesperetina é o produto gerado da reação da hesperidina com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

Para confirmar a identidade do produto obtido na reação, as amostras ainda foram avaliadas em espectrofotômetro de massas. Os espectros de massas obtidos para a hesperidina, para a hesperidina reagida com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e para a hesperetina estão apresentados na Figura 23, respectivamente pela denominação A, B e C.

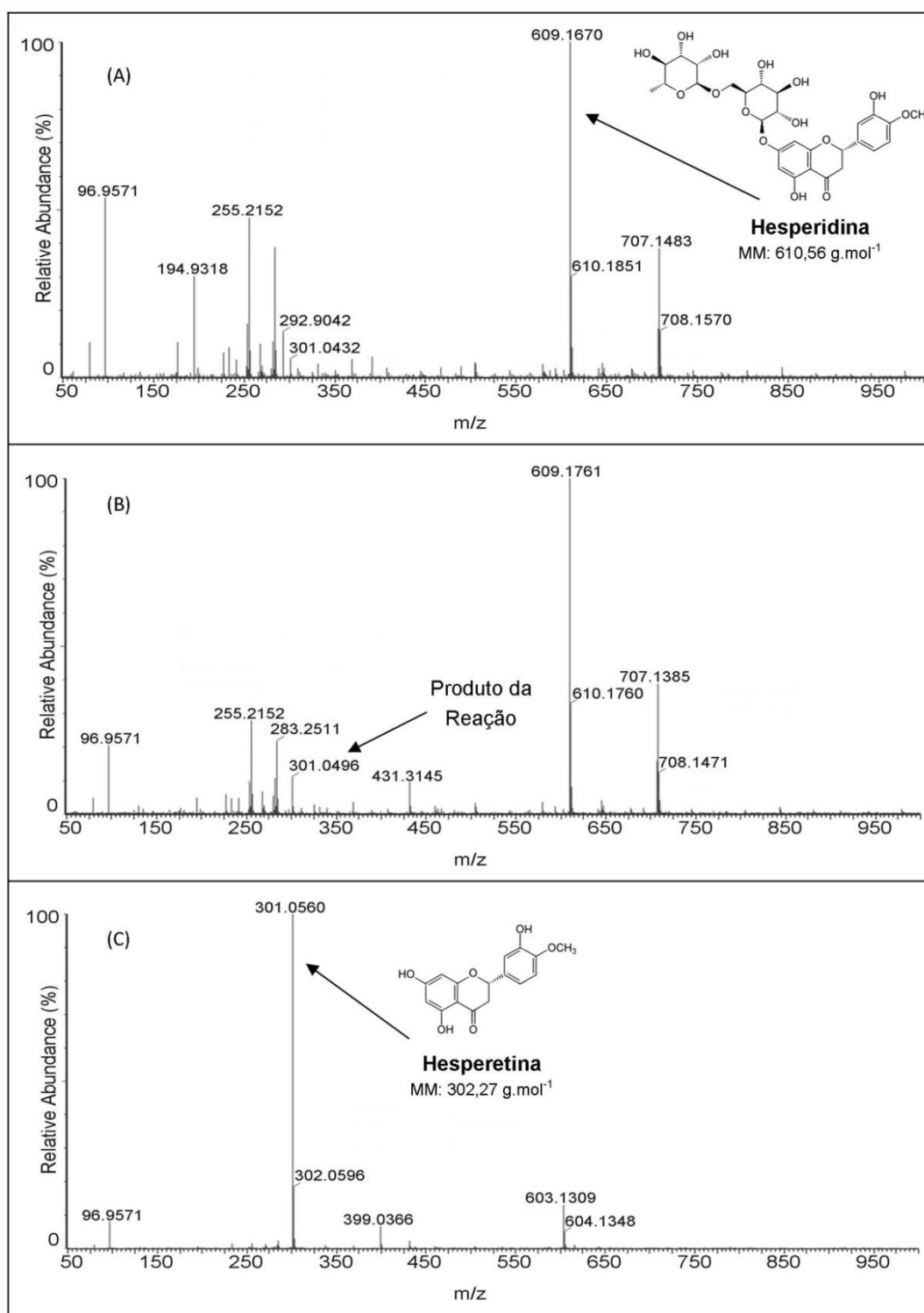


Figura 23: Espectro de massas da reação a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos de (A) hesperidina, (B) hesperidina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e (C) hesperetina, indicando a formação de hesperetina como produto da reação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* com hesperidina.

Comparando-se a m/z do produto formado da reação da hesperidina com o extrato semipurificado de tanase, com a m/z da hesperetina nas mesmas condições, pode-se confirmar que a hesperetina é o produto gerado da reação. O espectro de massas obtido para a hesperidina reagida com o extrato semipurificado de tanase (Figura 23B) apresenta o aparecimento do composto com m/z de 301.04, que coincide com a m/z da hesperetina nas mesmas condições (Figura 23C). Nenhum composto com a mesma m/z aparece no espectro de massas do tampão e do controle da enzima (Anexo B), no entanto, conforme observado no cromatograma do tempo zero da Figura 21, a hesperidina não é um padrão puro e mesmo sem reação já apresentava uma pequena quantidade de hesperetina na sua composição. Apesar disso, os resultados indicam um aumento na concentração de hesperetina com o decorrer da reação e assim como o observado para a rutina, a tanase de *P. variotii* atuou na remoção do dissacarídeo rutinose da molécula de hesperidina.

A literatura mostra que a hesperidinase é um tipo de ramnosidase capaz de atuar na molécula da hesperidina, formando rhamnose e hesperetina-7-glicosídeo (Nielsen et al., 2006), no entanto as preparações comerciais de ramnosidases (EC 3.2.1.40) obtidas a partir de *Aspergillus* e *Penicillium* estão normalmente contaminadas com atividade β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21) (MONTI et al., 2004). Esta mistura de enzimas, quando utilizada para a hidrólise das ligações glicosídicas dos flavonoides naringina ou hesperidina, é chamada de naringinase ou hesperidinase, respectivamente (SORIA et al., 2012).

Neste estudo, a hidrólise da hesperidina não pareceu ocorrer pela atuação de uma hesperidinase devido à ausência de picos adicionais nos cromatogramas da hesperidina (Figura 21) que indicassem a formação do intermediário da reação hesperetina-7-glicosídeo, assim como, à ausência de compostos com massa molecular que caracterizassem esse intermediário (± 464 g/mol) no espectro de massas (Figura 23). Assim, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* pareceu atuar em uma única etapa, diretamente na ligação glicosídica no carbono C7 (anel A) do esqueleto do flavonoide, entre o dissacarídeo e a aglicona hesperetina, diferentemente do ocorrido com a rutina, onde a ligação glicosídica estava no carbono C3 do esqueleto do flavonoide. A Figura 24 apresenta uma indicação da atuação do extrato semipurificado de tanase na hesperidina.

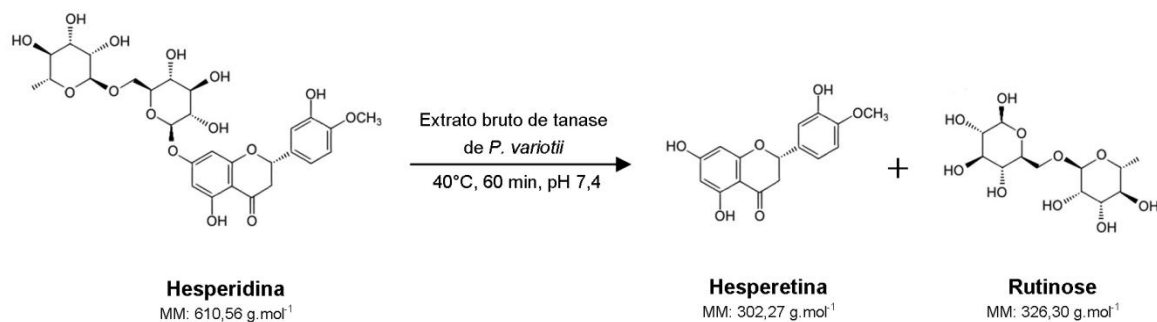


Figura 24: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* em hesperidina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.

A naringina (naringenina-7-O-neohesperidosídeo), assim como a hesperidina, possui seu dissacarídeo e aglicona unidos por meio de uma ligação glicosídica no carbono C7, no entanto, o dissacarídeo da naringina é uma neohesperidose (2-O- α -L-ramnosil-D-glicose). A Figura 25 apresenta o cromatograma da reação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* com naringina.

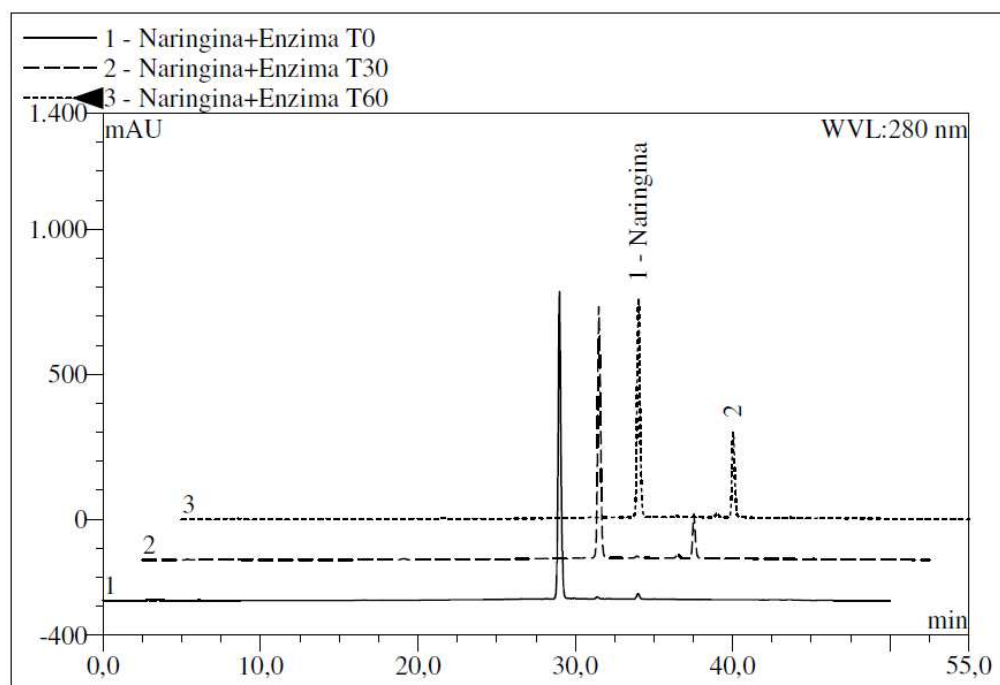


Figura 25: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da naringina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando a formação de um produto da reação com o decorrer do tempo.

Conforme o esperado, os cromatogramas das reações nos tempos 30 e 60 minutos apresentaram o aparecimento de um pico além do pico referente ao substrato naringina, indicando a formação de um produto da reação. Para a identificação deste composto foi necessário comparar seu tempo de retenção e espectro de absorção, com o produto obtido pela hidrólise de naringina com naringinase comercial (Anexo Q). A naringinase é um complexo enzimático com atividade α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21) e catalisa a conversão de naringina em naringenina em um processo de duas etapas: primeiramente o substrato naringina é hidrolisado pela porção α -L-ramnosidase para produzir ramnose e prunina, que então é convertido pela porção β -D-glicosidase em glicose e naringenina (NOROUZIAN et al., 2000). A Figura 26 apresenta o cromatograma da reação da naringina com a tanase de *P. variotii* no tempo 60 minutos e cada pico representado está identificado com seu tempo de retenção e espectro de absorção.

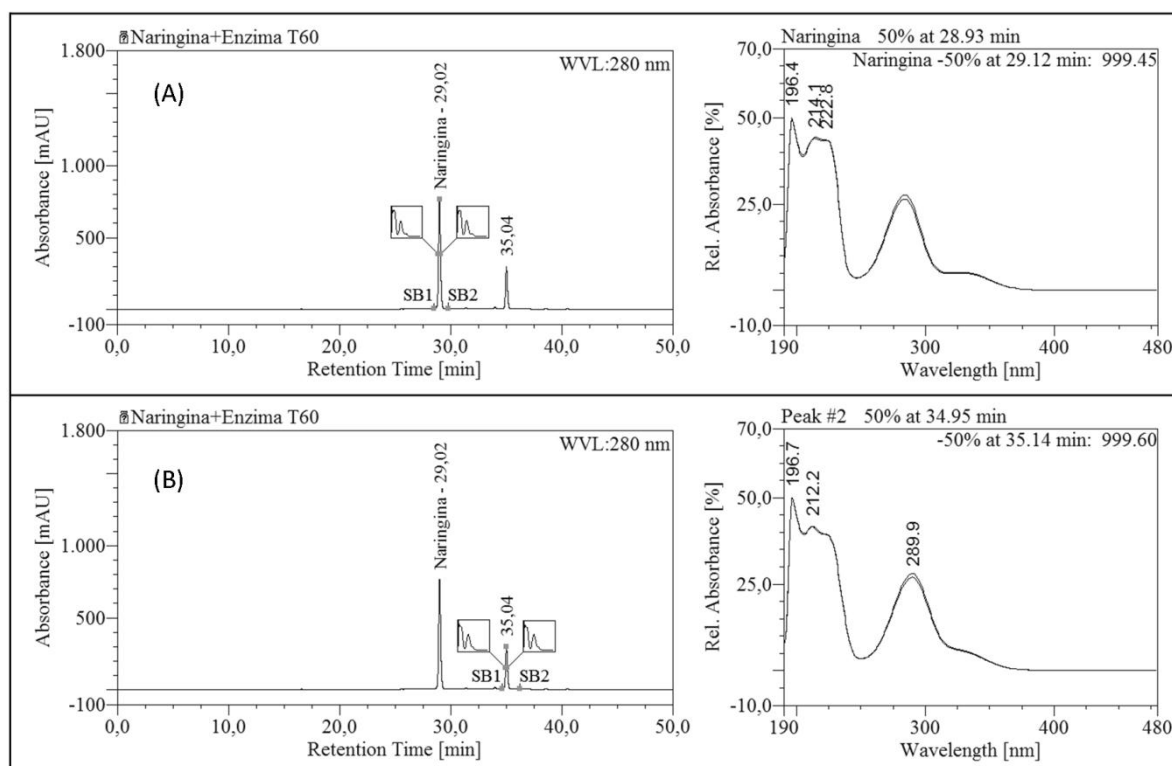


Figura 26: Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 280 nm da reação de naringina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos com (A) destaque para o espectro de absorção da naringina e (B) destaque para o espectro de absorção do produto da reação.

Conforme observado na Figura 26B, o produto obtido da reação da naringina com o extrato semipurificado de tanase apresenta o mesmo tempo de retenção de 35 minutos do produto obtido na reação de naringina com naringinase comercial (Anexo Q). Além disso, os pontos de máxima absorção nos espectros dos produtos das duas reações são muito semelhantes. Devido ao fato da naringina ter sido totalmente hidrolisada pela naringinase comercial antes dos 30 minutos de reação (Anexo P), não foi possível visualizar as duas etapas dessa reação nas condições empregadas nesse estudo, observando-se nos cromatogramas apenas o produto final da reação, a naringenina (aglicona). Assim esse resultado fornece forte indício de que também é a naringenina o produto gerado da reação da naringina com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

Para confirmar a identidade do produto obtido na reação, as amostras ainda foram avaliadas em espectrofotômetro de massas. Os espectros de massas obtidos para a naringina e para a naringina reagida com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* estão apresentados na Figura 27, respectivamente pela denominação A e B.

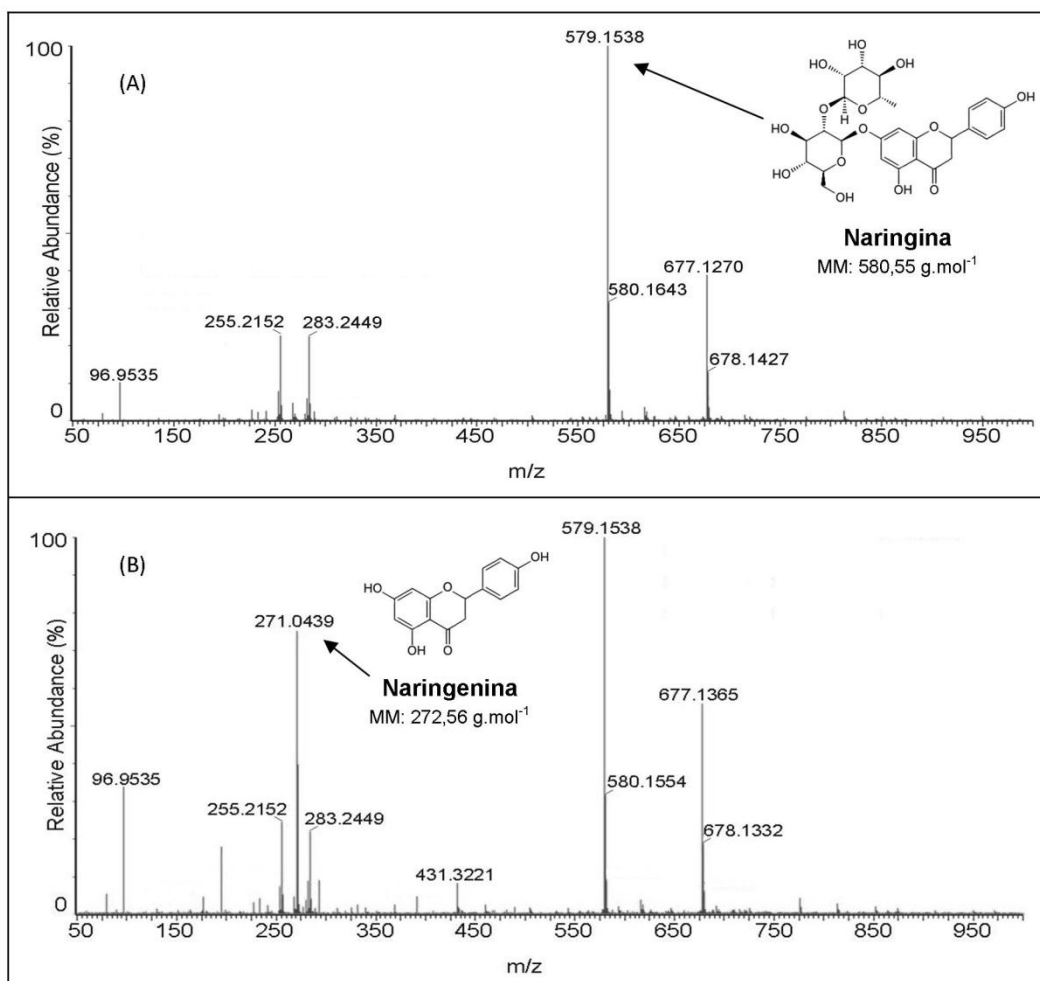


Figura 27: Espectro de massas da reação a 40°C e pH 7,4 no tempo 60 minutos de (A) naringina e (B) naringina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii*, indicando a formação de naringenina como produto da reação.

A análise da reação de 60 minutos do extrato semipurificado de tanase com naringina (Figura 27B) apresenta a formação de um produto com m/z de 271.04, o que aumenta os indícios da formação da naringenina como o produto da reação, devido à massa molecular desta aglicona ser de $\pm 272 \text{ g.mol}^{-1}$, além disso, nenhum composto com a mesma m/z aparece no espectro de massas do tampão e do controle da enzima (Anexo B).

No entanto, apesar da hidrólise da naringina pelo extrato semipurificado de tanase ter sido parcial ao longo dos 60 minutos avaliados, nenhum dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD ou espectros de massas indicaram a formação de prunina ($\pm 434 \text{ g.mol}^{-1}$) como intermediário da reação. O composto com m/z de 431.32 é proveniente da

enzima e está presente em todos os outros espectros de massas vistos das reações com o extrato semipurificado de tanase. Sendo assim, a ação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* provavelmente ocorreu em uma única etapa. A Figura 28 ilustra a hidrólise de naringina pelo extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* nas condições avaliadas e indica a atuação da enzima na remoção do dissacarídeo neohesperidose do substrato em questão.

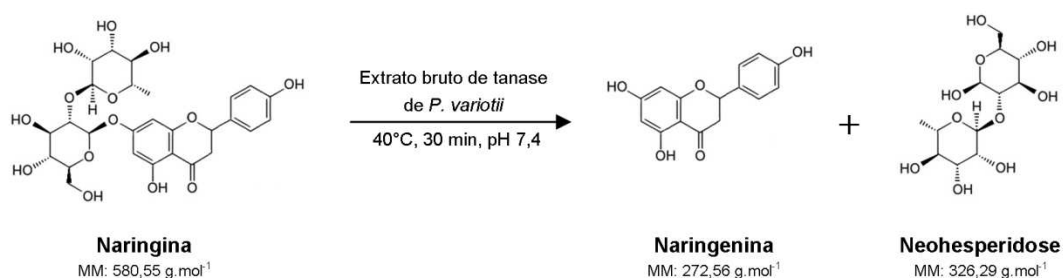


Figura 28: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* em naringina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.

Estudos sobre a regulação da atividade enzimática da tanase indicaram que a enzima pode reagir com qualquer hidroxila fenólica, no entanto, para que ocorra a formação de um verdadeiro complexo enzima-substrato, o substrato deveria ser um composto de éster de ácido gálico (IIBUCHI; MINODA; YAMADA, 1972). Por outro lado, segundo Rodríguez-Durán et al. (2011), as tanases são um grupo de esterases com média especificidade ao substrato, sendo esta especificidade dependente da matriz e dos métodos utilizados para o isolamento e purificação da enzima. Além disso, a partir de um determinado organismo, variados sistemas isoenzimáticos da tanase com afinidade a diferentes substratos poderiam ser isolados.

Este estudo verificou que, além da hidrólise do ácido tânico* em ácido gálico, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* foi capaz de hidrolisar diferentes flavonoides glicosilados. Diglicosidases são enzimas capazes de hidrolisar diretamente a segunda ligação β -glicosídica a partir da extremidade não redutora de um glicosídeo, liberando uma

* A hidrólise do ácido tânico em ácido gálico foi avaliada conforme metodologia descrita no item 3.1.2.1 para determinação da atividade enzimática da tanase.

unidade de dissacarídeo e uma aglicona (CHUANKHAYAN et al., 2007). Assim, tendo os resultados deste estudo indicado uma capacidade do extrato semipurificado de tanase em hidrolisar diretamente a ligação β -glicosídica entre as agliconas e os dissacarídeos dos flavonoides estudados, observou-se a atividade de uma diglicosidase neste extrato. Além disso, o extrato enzimático apresentou baixa especificidade ao substrato, tanto para a porção aglicona quanto para o dissacarídeo, visto que foi capaz de hidrolisar flavonoides de diferentes classes e ainda com os diferentes dissacarídeos rutinose e neohesperidose. Pelo que se tem conhecimento, nenhum trabalho até hoje avaliou a atuação de uma enzima tanase na hidrólise de flavonoides glicosilados.

Não se pode deixar de levar em consideração o fato da tanase empregada neste estudo ser um extrato semipurificado e, que por esta razão, pode expressar outras atividades além de tanase. Segundo estudos de Schons (2009), no extrato enzimático semipurificado obtido por *Paecilomyces variotii* verificou-se, além da atividade de tanase, a atividade das enzimas carboximetilcelulase, polimetilgalacturonase, fitase e protease, embora pouco representativas. Assim, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* também foi caracterizado quanto sua atividade de β -glicosidase nas condições empregadas nesse estudo (pH 7,4 e 40°C) e os resultados obtidos mostraram uma atividade específica de 0,334 U/mg de proteína (sendo 1U definido como a quantidade em μ mol de p-nitrofenol formado por minuto de reação). Portanto, o extrato semipurificado de tanase estudado também apresentou atividade de β -glicosidase, no entanto, a hidrólise dos flavonoides glicosilados avaliados neste trabalho não pode ser explicada somente por essa atividade enzimática, tendo visto que os dissacarídeos ligados a essas moléculas são compostos pelos açúcares ramnose e glicose. Sarry et al. (2008) obtiveram um extrato enzimático a partir da casca da uva Moscatel com quatro diferentes atividades de β -glicosidase (β -xilosidase, β -diglicosidase, β -glicosidase e β -fructosidase) capazes de hidrolisar dissacarídeos em uma ou duas etapas, entretanto, incapazes de remover o dissacarídeo dos flavonoides glicosilados rutina, naringina e hesperidina. Assim, seria necessária a presença no extrato enzimático de uma diglicosidase não específica para conseguir atuar na remoção dos dissacarídeos dos flavonoides rutina, naringina e hesperidina em uma única etapa.

Assim como a tanase purificada descrita por Ramírez-Coronel et al. (2003) atuou na hidrólise de celobiose, a tanase de *P. variotii* em estudo poderia apresentar, além das atividades esterásicas e depsídicas já descritas na literatura, atividade na hidrólise de ligações glicosídicas. No entanto, para total confirmação dessa nova atividade, seria recomendável a purificação do extrato enzimático. Os resultados obtidos com esse estudo indicam novas possibilidades de aplicações para o extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii*.

5 CONCLUSÕES

Avaliando-se todos os resultados obtidos, o extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* foi capaz de atuar na hidrólise de ácido tânico, rutina, naringina e hesperidina nas condições avaliadas. Este resultado mostra que além das atividades esterásicas e depsídicas já descritas na literatura para tanase, o extrato enzimático atuou na ligação entre a aglicona e o dissacarídeo dos flavonoides estudados, indicando uma provável atividade de diglicosidase. Diferentemente do obtido em outros estudos, o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* não foi capaz de hidrolisar o ácido clorogênico em ácido cafeico e ácido quínico nas condições empregadas para o teste. Nenhum outro trabalho encontrado relatou a hidrólise de flavonoides glicosilados por tanase, o que pode representar grande potencial da aplicação desse extrato no aumento da biodisponibilidade e bioatividade de polifenóis em alimentos.

Futuros estudos devem avaliar a atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* em outras classes de flavonoides glicosilados como as isoflavonas e as antocianinas ou em alimentos com grande quantidade de flavonoides glicosilados. Além disso, seria importante avaliar a especificidade da enzima purificada frente aos mesmos substratos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUILAR, C.N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International**, v. 7, n. 5, p. 373-382, 2001.

AGUILAR, C.N. et al. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 47-59, 2007.

AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some properties of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 79-85, 1976a.

AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Chemical composition and molecular weight of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 297-302, 1976b.

BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 612-614, 1997.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1832-1837, 2007a.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, 2007b.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of *Paecilomyces variotii*. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 207-216, 2007c.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. de. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 228-233, 2008.

BHAT, T.K.; SINGH, B.; SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins - a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 135-139, 1997.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CARIDI, D. et al. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 105, p. 691-699, 2007.

CARUSO, F. et al. Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7279-7285, 2004.

CHUANKHAYAN, P. et al. Functional and structural differences between isoflavonoid β -glycosidases from *Dalbergia* sp. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 468, p. 205-216, 2007.

CURIEL, J.A. et al. Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6224-6230, 2009.

D'ARCHIVIO, M. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DAS, S.; ROSAZZA, J.P.N. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 499-508, 2006.

DE MEJÍA, E.G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23-34, 2010.

DYCKERHOFF, H. Process for treating coffee. **U.S. Patent**, n. 2,089,116, 1937.

ESCARPA, A.; GONZALES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

FRESCO, P. et al. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 6, p. 747-766, 2006.

GARCÍA-CONESA, M.T. et al. Hydrolysis of diethyl diferulates by tannase from *Aspergillus oryzae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 319-324, 2001.

GEORGETTI, S.R. et al. Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 459-466, 2009.

HÄKKINEN, S.H. et al. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 75-80, 2000.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, n. 37, p. 937-942, 1999.

HUANG, W.; CAI, Y.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2010.

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

IIBUCHI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *Asp. oryzae* n.º7. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 1553-1562, 1972.

JEANDET, P. et al. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 316-319, 1995.

KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 355-361, 1999.

LA TORRE, G.L. Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. **Food Chemistry**, v. 85, p. 259-266, 2004.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, Filippo (Ed.). **Phytochemistry: Advances in Research**. India : Research Signpost, c. 2, p. 23-67, 2006.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Production and application of tannin acyl hidrolase: state of the art. **Advances in Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

LU, M.; CHEN, C. Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea. **Food Research International**, n. 41, p. 130-137, 2008.

MACEDO, G.A; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 833-838, 2005.

MACEDO, J.A. et al. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, p. 491-497, 2011.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation - a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 9, p.1623-1627, 1995.

MAZZA, G.; CACACE, J.E.; KAY, C.D. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 1, p. 129-145, jan/fev, 2004.

MINGSHU, L. et al. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 68-84, 2006.

MONDAL, K.C.; BANERJEE, R.; PATI, B.R. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 9, p. 767-769, 2000.

MONTI, D. et al. Generation of an α -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 763-771, 2004.

MUKHERJEE, G.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 42-48, 2004.

NAM, H. et al. Quercetin production from rutin by a thermostable β -rutosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 483-489, 2012.

NARIKAWA, T.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. A β -rutosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p. 1317-1319, 2000.

NIEHAUS, J.U.; GROSS, G.G. A gallotannin degrading esterase from leaves of pedunculate oak. **Phytochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1555-1560, 1997.

NIELSEN, I.L.F. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 404-408, 2006.

NOROUZIAN, D. et al. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 16, p. 471-473, 2000.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, nov/dez, 2009.

PARANTHAMAN, R. Optimisation of fermentation conditions for production of tannase enzyme by *Aspergillus oryzae* using sugarcane bagasse and rice straw. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 3, n. 2, p. 105-110, 2008.

PERKIN, A.G. Derivatives of hesperitin. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 73, p. 1031-1038, 1898.

PINTO, G.A.S. et al. Tanase : conceitos, produção e aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.435-462, 2005.

POPOVA, L.N.; TIKOTSKAYA, K.M. Comparative biological activity of quercetin and some of its conversion products. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 71, n. 4, p. 392-394, 1971.

RAJAKUMAR, G.; NANDY, S. C. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 525-527, 1983.

RAMÍREZ-CORONEL, M.A. et al. A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. **Microbiology**, v. 149, p. 2941-2946, 2003.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, 1997.

RODRIGUEZ-DURAN, L.V. et al. Novel strategies for upstream and downstream processing of tannin acyl hydrolase. **Enzyme Research**, v. 2011, 20 p. DOI:10.4061/2011/823619.

SAKAKIBARA, H. et al. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 571-581, 2003.

SANDERSON, G. et. al. Green tea conversion using tannase and natural tea enzymes. **U.S. Patent**, n. 3,812,266, 1974.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SARRY, J. et al. Combined mass mapping and biochemical characterization of grape β -glycosidase-enriched extract. **The Protein Journal**, v. 27, p. 258-266, 2008.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition.**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHONS, P.F. **Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico**. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2009.

SELWAL, M.K. et al. Optimization of cultural conditions for tannase production by *Pseudomonas aeruginosa* IIIB 8914 under submerged fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 599-605, 2010.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004.

SHARMA, S.; BHAT, T.K.; DAWRA, R.K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 85-89, 2000.

SORIA, F. et al. α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1127-1134, 2012.

TRANCHIMAND, S. et al. Biochemical and molecular characterization of a quercetinase from *Penicillium olsonii*. **Biochimie**, v. 90, p. 781-789, 2008.

TRANCHIMAND, S.; BROUANT, P.; IACAZIO, G. The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase. **Biodegradation**, v. 21, p. 833-859, 2010.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 367-379, 2003.

YANG, C.S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v.21, p. 381-406, 2001.

YAO, J. et al. Isolation and characterization of a novel tannase from a metagenomic library. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 3812-3818, 2011.

CAPÍTULO III

INCREMENTO DA BIOATIVIDADE DE POLIFENÓIS DO SUCO DE LARANJA POR AÇÃO DA TANASE DE *Paecilomyces variotii*

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja concentrado e estudos mostram que essa bebida possui grande capacidade antioxidante, em parte relacionada aos polifenóis presentes em sua composição. Os compostos fenólicos em frutos cítricos são geralmente encontrados conjugados com açúcares, o que reduz sua capacidade de atuar como antioxidantes. A fim de aumentar a atividade funcional de tais compostos, o extrato semipurificado de tanase obtido do micro-organismo *Paecilomyces variotii* foi avaliado quanto a sua capacidade de biotransformar os polifenóis presentes em suco de laranja e os padrões comerciais hesperidina e naringina. O suco de laranja foi submetido à análise de sólidos solúveis totais, acidez total titulável, pH, vitamina C e teor de fenólicos totais. Além disso, o suco de laranja e os padrões de hesperidina e naringina foram avaliados por CLAE-DAD e as alterações na capacidade antioxidante das amostras foram testadas *in vitro* pelos métodos ORAC e de sequestro de radicais DPPH. Os resultados mostraram que a acidez titulável, pH, sólidos solúveis e vitamina C não apresentaram diferença significativa após o tratamento enzimático do suco de laranja com extrato semipurificado de tanase, no entanto, houve um aumento de 16,8% no teor de fenólicos totais. Além disso, o extrato semipurificado de tanase foi capaz de modificar o perfil polifenólico obtido por CLAE-DAD do suco de laranja e converter os padrões hesperidina e naringina nas suas formas agliconas com maior atividade antioxidante do que suas formas glicosiladas. A atividade antioxidante do suco de laranja biotransformado pelo extrato de tanase aumentou cerca de 50% pelo método ORAC e 70% pelo método DPPH. Esses resultados foram melhores do que os resultados obtidos com a biotransformação do suco de laranja por naringinase comercial. Este trabalho revela novos substratos para a tanase obtida de *Paecilomyces variotii* e confirma que a biotransformação é uma boa estratégia para melhorar a atividade antioxidante *in vitro* de suco de laranja.

Palavras-chave: Tanase, suco de laranja, biotransformação, atividade antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja sendo que a maior parte dessas frutas destina-se à indústria de suco concentrado. O suco de sabor laranja é a bebida à base de frutas mais consumida no mundo (NEVES et al., 2010) e pode ser destacado como uma importante fonte de vitamina C e compostos fenólicos (KLIMCZAK et al., 2007). Os principais representantes dos compostos fenólicos encontrados em frutos cítricos são os ácidos fenólicos e os flavonoides (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997) e estudos têm observado um efeito protetor dos flavonoides contra doenças cardiovasculares, degenerativas e alguns tipos de câncer (BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008).

Os flavonoides são encontrados nos frutos cítricos principalmente como glicosídeos (GATTUSO et al., 2007) e em geral, essa glicosilação confere uma desvantagem na capacidade antioxidante destes compostos quando comparados com as agliconas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). A capacidade dos polifenóis em atuar como antioxidante *in vivo* ainda está relacionada em parte, com a biotransformação destes no trato gastrointestinal (SPENCER, 2006). Sendo assim, a hidrólise enzimática desses conjugados fenólicos pode ser uma estratégia para aumentar a concentração de polifenóis livres e a atividade biológica de vários alimentos (GEORGETTI et al., 2009). Battestin, Macedo e Freitas (2008) estudaram a capacidade da tanase de *Paecilomyces variotii* em hidrolisar epigallocatequina galato de chá verde em epigallocatequina e ácido gálico e constataram a maior atividade antioxidante após a hidrólise enzimática.

Dessa forma, a enzima tanase obtida pelo micro-organismo *Paecilomyces variotii* foi utilizada neste estudo com o objetivo de hidrolisar a fração glicosídica ou conjugada dos flavonoides presentes na matriz alimentar suco de laranja, e assim, avaliar possíveis alterações nas propriedades químicas e na atividade antioxidante em decorrência de uma biotransformação, o que justificaria a utilização dessa técnica no aumento da capacidade funcional de alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUCO DE LARANJA

Detendo 53% da produção mundial de suco de laranja concentrado, o Brasil exporta aproximadamente 98% dessa produção, sendo a Europa o principal destino das exportações (NEVES et al., 2010). O suco de laranja é constituído por vários componentes orgânicos voláteis responsáveis pelo seu sabor e aroma, além de açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e pigmentos (CORREA NETO; FARIA, 1999). Dentre as bebidas à base de frutas, o suco de sabor laranja é a bebida mais consumida no mundo, com 35% de participação no mercado (NEVES et al., 2010), sendo bastante procurada por consumidores que desejam compor uma alimentação saudável (LEE; COATES, 1999). O suco de laranja é uma importante fonte de antioxidantes na dieta (STELLA et al., 2011). Estudos atribuem grande parte da capacidade antioxidante dessa bebida à vitamina C (GARDNER et al., 2000), no entanto, o conteúdo de compostos fenólicos totais também contribui com fração significativa (RAPISARDA et al., 1999).

2.2 FLAVONOIDES EM FRUTOS CÍTRICOS

Compostos fenólicos ou polifenóis são definidos quimicamente como substâncias com um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxilas ou derivados funcionais como ésteres, éteres de metila e glicosídeos (ESCARPA; GONZALES, 2001). Eles são considerados metabólitos secundários envolvidos na defesa química das plantas e constituem um dos grupos mais amplamente encontrados nas fontes vegetais (LATTANZIO; LATANZIO; CARDINALI, 2006). Os principais representantes dos polifenóis são os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e lignanas, sendo os ácidos fenólicos e os flavonoides os principais grupos de compostos fenólicos encontrados em frutos cítricos (MANACH et al., 2004; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Os flavonoides possuem uma estrutura consistindo de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três átomos de carbono formando um heterociclo oxigenado (anel C). Eles estão divididos em classes de acordo com o tipo de heterociclo (anel C) envolvido em: flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas, flavanonas e flavanóis (MANACH et al., 2004). A Figura 1 apresenta a estrutura geral e padrão de numeração dos flavonoides, sendo as ligações, posições de insaturações e grupos funcionais específicos para cada classe (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

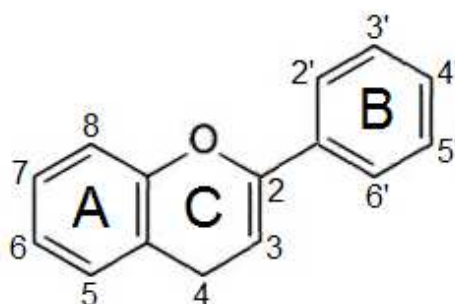


Figura 1: Estrutura geral e padrão de numeração dos flavonoides.
Fonte: Aherne e O'Brien (2002).

Os flavonoides estão presentes em frutas cítricas principalmente como glicosídeos, sendo que a glicosilação ocorre geralmente na posição C7 da aglicona por um dissacarídeo rutinose (6-O- α -L-ramnosil-D-glicose) ou neohesperidose (2-O- α -L-ramnosil-D-glicose) (GATTUSO et al., 2007). É importante ressaltar que, as moléculas de flavonoides não ligadas a qualquer outra substância química são denominadas agliconas, enquanto que as moléculas de flavonoides vinculadas a açúcares são denominadas flavonoides glicosilados (ESCARPA; GONZALES, 2001). A Tabela 1 apresenta a estrutura dos principais flavonoides encontrados em frutos cítricos.

Tabela 1: Características estruturais dos principais flavonoides presentes em frutos cítricos na forma de agliconas e glicosídeos.

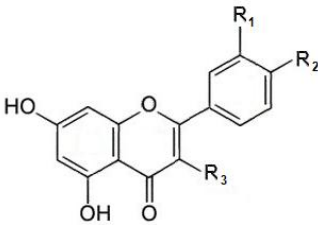
Composto	Estrutura Química		
	R1	R2	R3

Flavanonas

<i>Aglicona</i>			
Naringenina	OH	H	OH
Hesperetina	OH	OH	OCH ₃
<i>Rutinosídeos (com dissacarídeo rutinose – Rut)</i>			
Narirutina	O-Rut	H	OH
Hesperidina	O-Rut	OH	OCH ₃
Didimina	O-Rut	H	OCH ₃
Eriocitrina	O-Rut	OH	OH
<i>Neohesperidosídeos (com dissacarídeo neohesperidose – NH)</i>			
Naringina	O-NH	H	OH
Neohesperidina	O-NH	OH	OCH ₃
Poncicrina	O-NH	H	OCH ₃
Neoeriocitrina	O-NH	OH	OH

Flavonas

<i>Aglicona</i>		
Apigenina	H	OH
Luteolina	OH	OH
Diosmetina	OH	OCH ₃

Composto	Estrutura Química		
	R1	R2	R3
Flavonóis			
<i>Aglicona</i>			
Quercetina	OH	OH	OH
Kampferol	H	OH	OH

Fonte: Adaptado de Tripoli et al. (2007).

Os flavonoides podem influenciar a aparência, o sabor e o valor nutricional de frutos e sucos cítricos de muitas maneiras. Nos sucos de limão e laranja, por exemplo, a hesperidina pode contribuir para a formação de sedimentos que resultam em uma turbidez indesejável, enquanto que a naringina tem influência direta na amargura dos sucos de toranja e bergamota (GATTUSO et al., 2007). Em geral, as flavanonas glicosiladas com neohesperidose são características por possuírem um sabor amargo, enquanto as flavanonas glicosiladas com rutinose não possuem sabor (TRIPOLI et al., 2007).

Dentre os frutos cítricos, estudos mostram que o suco de laranja (*Citrus sinensis*) é composto principalmente pelas flavanonas hesperidina e narirutina, sendo a hesperidina a mais abundante, e por ácidos fenólicos como o ácido ferúlico, sendo que a quantidade destes compostos pode variar com a variedade da fruta utilizada. Também podem ser encontrados em suco de laranja, mas em menor quantidade, a flavona apigenina, os ácidos fenólicos sinápico, clorogênico, cafeico e p-cumárico, e as flavanonas didimina, naringina e neohesperidina (KELEBEK et al., 2009; RAPISARDA et al., 1999).

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES

Estudos têm demonstrado que os flavonoides possuem diversas propriedades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias e antivirais, e proteção contra câncer e

doenças cardiovasculares, em parte relacionadas com as suas propriedades antioxidantes (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; SAIJA et al., 1995).

De acordo com Pietta (2000) os mecanismos de ação antioxidante dos flavonoides incluem o sequestro direto de radicais livres, como os radicais peroxila, alcoxila, hidroxilas e anion superóxido; e a prevenção da formação desses radicais, atuando na inibição de enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio, como as lipoxigenases, cicloxigenases e xantina oxidases, e na quelação de metais de transição, como o ferro.

A estrutura química dos flavonoides apresenta três requisitos possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais: (1) presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B que confere uma maior estabilidade à forma radicalar; (2) ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, que aumenta a deslocalização eletrônica a partir do anel B; (3) grupos hidroxilo nas posições C3 e C5 com a função 4-oxo, que promove a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (BORS et al., 1990 *apud* SILVA et al., 2002).

Os flavonoides são geralmente encontrados como glicosídeos, mas a glicosilação na posição C7 do anel A da aglicona resulta em uma maior redução da atividade antioxidante do flavonoide do que quando essa glicosilação ocorre na posição C3 do heterociclo. Em geral, independentemente da posição na estrutura, uma glicosilação raramente confere uma vantagem antioxidante sobre a aglicona, visto que a O-glicosilação pode interferir na capacidade de deslocalização eletrônica (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Embora muitos estudos relacionem os efeitos benéficos dos flavonoides com as suas propriedades antioxidantes, efeitos como anti-inflamatórios e antitumorais, não poderiam ser explicados unicamente por essas propriedades. Estudos sobre o mecanismo de ação destas moléculas têm encontrado vários indícios sobre o fato de que os flavonoides também podem modular processos de sinalização celular através de ações nas cascatas de sinalização de proteínas quinases e lipídios quinases, ou ainda, eles próprios podem atuar como agentes de sinalização (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

A base para esta conclusão é que os flavonoides e os seus metabólitos possuem concentração *in vivo* pouco significativa quando comparada com antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol, no entanto, essa concentração *in vivo* é suficiente para os flavonoides apresentarem atividade farmacológica em receptores, enzimas e fatores de transcrição. Assim, os flavonoides são potentes moléculas bioativas, no entanto é fundamental um maior entendimento dos seus mecanismos de ação tanto como antioxidantes quanto como moduladores da sinalização celular, para melhor avaliação de seu potencial benéfico à saúde (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

2.4 BIODISPONIBILIDADE DE FLAVONOIDES

A biodisponibilidade de um composto, ou seja, a fração de interesse que chega à circulação sistêmica depende de inúmeras variáveis, tais como a complexidade da matriz, a estrutura química do composto de interesse e o tempo de trânsito intestinal (HOLST; WILLIAMSON, 2008). Assim, os polifenóis mais comuns na dieta humana não são necessariamente os mais ativos, pois eles podem possuir menor atividade intrínseca, serem mal absorvidos no intestino, altamente metabolizados ou ainda, rapidamente eliminados (MANACH et al., 2004). Além disso, foi verificada uma variação considerável na biodisponibilidade dos flavonoides entre diferentes indivíduos, possivelmente devido a diferenças na microbiota gastrointestinal (ERLUND et al., 2001).

O mecanismo de absorção e ação dos flavonoides no organismo ainda não está totalmente esclarecido. Estudos mostram que apenas as agliconas e alguns polifenóis ligados à glicose podem ser absorvidos no intestino delgado (MANACH et al., 2004). Com exceção das antocianinas, os flavonoides glicosilados parecem sofrer deglicosilação por enzimas intestinais no lúmen ou nas células do intestino delgado antes de serem absorvidos (ERLUND, 2004). No entanto, as flavanonas rutina, hesperidina, naringina e narirutina, que estão conjugadas aos dissacarídeos rutinose ou neohesperidose, não são substratos para as β -glicosidases do intestino delgado, e parecem ter as agliconas absorvidas no cólon após hidrólise por enzimas intestinais de origem bacteriana, tais como α -ramnosidases e β -glicosidases (ERLUND et al., 2001; MANACH et al., 2003).

Sendo assim, os polifenóis alcançam maiores concentrações no intestino do que em outros tecidos e, devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, esses compostos têm sido avaliados na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Estudos utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* tem fornecido evidências de que compostos polifenólicos puros e extratos polifenólicos de plantas, através da modulação de cascatas de sinalização intracelulares na célula intestinal, podem atuar na inflamação intestinal, como por exemplo, na redução da severidade da colite em ratos. No entanto, ainda são necessários maiores estudos em seres humanos sobre os efeitos benéficos dos polifenóis nesse tipo de inflamação (BIASI et al., 2011; ROMIER et al., 2009).

Durante a absorção através da membrana intestinal, os flavonoides são transformados em seus glucoronídeos e sulfatos, pois esta forma apresenta maior facilidade de transporte e excreção do que as agliconas (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; PIETTA, 2000). A pequena porção absorvida é metabolizada por enzimas hepáticas, tornando esses conjugados mais polares, que então são excretados pela urina ou retornam ao duodeno por meio da vesícula biliar. No entanto, a maior parte dos flavonoides ingeridos não é absorvida, sendo degradada pela microbiota intestinal em ácidos fenólicos (PIETTA, 2000).

Em estudos de Hollman et al. (1995), pacientes com ileostomia* (para evitar perdas em decorrência da microbiota intestinal) receberam um suplemento de cebolas fritas no café da manhã (rica em glicosídeos de quercetina ligados à glicose, equivalente a 89 mg da aglicona), rutina pura (quercetina-3-rutinosídeo) equivalente a 100 mg da aglicona, ou 100 mg da aglicona quercetina pura, em ordem aleatória. A absorção da quercetina, definida como diferença entre a quantidade de quercetina na ingestão oral e na excreção da ileostomia, foi de 52% para os glicosídeos de quercetina das cebolas, 24% para a quercetina aglicona e 17% para a quercetina rutinosídeo, indicando que a absorção da quercetina é reforçada quando em conjugação com glicose.

Em outro estudo de Hollman et al. (1997), nove indivíduos receberam uma dose grande e única de cebolas, fonte de glicosídeos de quercetina ligados à glicose; maçãs, fonte glicosídeos de quercetina ligados à glicose e outros açúcares; e rutina pura, e tiveram

* Os pacientes com ileostomia tiveram o seu intestino grosso completamente removido e o íleo terminal trazido para a parede abdominal (HOLLMAN et al., 1995).

os níveis plasmáticos de quercetina avaliados durante 36 horas. As concentrações máximas de quercetina no plasma foram alcançadas em menos de 0,7 horas após a ingestão de cebola, 2,5 horas após ingestão das maçãs e 9 horas após ingestão do rutinosídeo. Os resultados mostraram que os glicosídeos de quercetina presentes na cebola foram mais rapidamente absorvidos do que os demais glicosídeos testados. Assim, a porção de açúcar dos glicosídeos de quercetina é um fator determinante para sua velocidade de absorção e biodisponibilidade.

Kanaze et al. (2007) avaliaram os parâmetros farmacocinéticos das agliconas hesperetina e naringenina no plasma e na urina de seres humanos, após uma administração única por via oral de cápsulas contendo uma dispersão sólida dos flavonoides estudados. Os autores concluíram que a hesperetina e a naringenina foram mais rapidamente absorvidas do que seus glicosídeos, quando comparados com dados da literatura, sendo observadas no plasma 20 minutos após a ingestão e com pico de concentração em 4,0 e 3,5 horas, respectivamente. A média dos valores da excreção urinária relativa cumulativa, em percentagem de dose administrada, foram aproximadamente 3% para a hesperetina e 6% para a naringenina, indicando baixa biodisponibilidade para ambas as agliconas, no entanto, os resultados foram quase semelhantes ao encontrado na literatura para os seus glicosídeos hesperidina e naringina.

2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES

Embora os flavonoides e outros polifenóis tenham sido identificados como potentes antioxidantes *in vitro*, a sua capacidade para atuar *in vivo* é dependente, em boa parte, da sua biotransformação e conjugação durante absorção a partir do trato gastrointestinal (SPENCER, 2006). Sendo assim, a fermentação ou hidrólise enzimática de fontes vegetais e seus produtos, têm sido estudados como uma estratégia para aumentar a concentração de polifenóis livres e a atividade biológica de vários alimentos (GEORGETTI et al., 2009).

A enzima β -glicosidase (EC 3.2.1.21) é conhecida por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas em aril e alquil β -glicosídeos, bem como glicosídeos contendo apenas

resíduos de carboidratos. Estudos mostraram que essa enzima ainda é capaz de hidrolisar glicosídeos fenólicos e liberar agliconas livres com maior potencial antioxidante do que o composto original e, portanto, tornando-as úteis para aplicações em indústrias de alimentos e bebidas (VATTEM; SHETTY, 2003).

Nielsen et al. (2006), em estudo duplo-cego em humanos, randomizado e controlado por placebo, verificaram uma melhora significativa na biodisponibilidade da aglicona hesperetina após modificação enzimática da hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosídeo) do suco de laranja. O produto hesperetina-7-glicosídeo gerado após remoção do grupo ramnose da hesperidina pela enzima hesperidinase comercial gerou uma concentração plasmática da aglicona hesperetina quatro vezes maior comparado à bebida não modificada e, além disso, a excreção urinária relativa de hesperetina foi significativamente superior nos indivíduos que consumiram o suco biotransformado.

Tanino acil hidrolases (EC 3.1.1.20), conhecidas como tanases, são enzimas capazes de hidrolisar ligações éster (entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose) e ligações depsídicas (ligação éster entre os anéis aromáticos) em substratos como ácido tânico (LEKHA; LONSANE, 1997). Battestin, Macedo e Freitas (2008) utilizaram tanase produzida por *Paecilomyces variotii* na hidrólise da epigallocatequina galato gerando os produtos epigallocatequina e ácido gálico os quais apresentaram maior poder antioxidante *in vitro* comparado ao substrato. Outro estudo com a aplicação da mesma enzima em chá verde e em erva mate, também resultou em aumento da atividade antioxidante das matrizes biotransformadas (MACEDO et al., 2011). Assim, enzimas com atividades em ligações ésteres e glicosídicas podem ser promissoras na obtenção de compostos fenólicos livres em alimentos.

2.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

O potencial antioxidante de diferentes amostras e de compostos puros pode ser avaliado por diversos métodos *in vitro* (MIGUEL et al., 2009), no entanto, não é recomendado medir a atividade antioxidante total de uma amostra utilizando apenas um único ensaio (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2002). Baseado nas reações químicas

envolvidas, os métodos de determinação da atividade antioxidante podem ser divididos em duas categorias: (1) ensaios baseados na reação de transferência de um átomo de hidrogênio (HAT) e (2) ensaios baseados na reação de transferência de elétrons (ET). Os ensaios baseados na reação de transferência de elétrons consistem de uma reação redox sendo o oxidante um indicador do ponto final da reação. Os métodos baseados na reação de transferência de um átomo de hidrogênio consistem de um gerador sintético de radical livre, uma sonda e um antioxidante, e geralmente monitoram a cinética competitiva da reação, sendo obtidas curvas que são utilizadas na quantificação (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

No presente trabalho, a capacidade antioxidante das amostras foi avaliada utilizando um método pertencente a cada categoria: o método de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), da categoria dos ensaios HAT; e o método de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), da categoria dos ensaios ET. O radical DPPH é um radical de nitrogênio relativamente estável (HUANG; OU; PRIOR, 2005). O método do sequestro de radicais DPPH é baseado na perda da coloração (decréscimo da absorbância) do radical DPPH quando este sofre redução em decorrência da ação de antioxidantes, podendo ser quantificada em espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS; CURVELIER; BERDET, 1995). O método ORAC se baseia na capacidade de determinados compostos inibirem a oxidação da fluoresceína induzida por radicais peróxido gerados pelo AAPH (2,2'-azinobis(2-amidinopropano)dihidrocloreto). Neste método, a amostra ou o padrão de referência é incubado a 37°C com um indicador fluorescente (sonda) e uma solução do iniciador AAPH. Com o decorrer da reação, os radicais peróxido reagem com o indicador fluorescente ocasionando um decaimento da fluorescência deste em função do tempo. Na presença de um antioxidante esse decaimento é temporariamente inibido (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO DE TANASE

A produção da enzima tanase foi realizada conforme estudo de Battestin e Macedo (2007) com modificações, utilizando o fungo *Paecilomyces variotii*, selecionado por Macedo, Matsuda e Battestin (2005). O micro-organismo foi cultivado em placas de petri com meio ágar batata-PDA (CM0139, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) contendo 0,5% (m/v) de ágar e 0,2% (m/v) de ácido tânico (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil) e incubado a 30°C por 72 horas em estufa Fanem (modelo 002/3, São Paulo, Brasil). O inóculo foi mantido sob refrigeração a 7°C até o momento do uso. A fermentação ocorreu em frasco de Erlenmeyer de 500 mL por meio de fermentação sólida, contendo 20 g de farelo de trigo (Natu's, Hortolândia, Brasil), 20 mL de água destilada e 10% de ácido tânico (m/m) (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil). O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e inoculado com suspensão de células de 9×10^6 células/mL. A suspensão de células foi produzida em homogeneizador do tipo Turrax (T 18 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, Alemanha) a partir da adição de 20 áreas circulares de 1,54 cm² (d = 1,4 cm), retiradas da placa de PDA inoculada, em 200 mL de água destilada estéril, sendo a contagem dos esporos feita em Câmara de Neubauer. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C por 120 horas.

Após a fermentação, à extração das enzimas foi realizada com a adição de 160 mL de tampão acetato 20 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e agitação em agitador orbital (Fermentation Design Incorporated, Allentown, EUA) a 200 rpm por 1 hora. O extrato foi filtrado e então, centrifugado a 9630 x g por 30 minutos a 4°C (Centrífuga Himac CR21GII, Hitachi, Tokyo, Japan). O sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo, Brasil) em concentração final de 80% de saturação (561g/L) e mantido sob refrigeração por 12 horas. O precipitado formado foi recolhido por centrifugação a 9630 x g por 30 minutos a 4°C e ressuspenso em água destilada para então, ser submetido à diálise em tubos de membrana de celulose (D9527-100ft, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)

por 48 horas em água destilada a fim de remover o excesso de sulfato de amônio. O extrato semipurificado obtido foi congelado a -18°C e liofilizado em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras Ind. Com. Serv. Liofilizadores Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) durante 24 horas. O extrato semipurificado liofilizado foi mantido a -18°C .

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A biotransformação dos substratos fenólicos e do suco de laranja foi realizada empregando o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e naringinase comercial de *Penicillium decumbens* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). O teor de proteínas totais de cada biocatalisador foi determinado segundo Bradford (1976) com o resultado expresso em mg de proteína/g enzima. Os métodos para determinação da atividade enzimática de tanase e naringinase estão descritos a seguir.

3.2.1 Tanase

A determinação da atividade enzimática do extrato semipurificado de tanase foi realizada a partir da reação com o ácido tânico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), conforme o método de Sharma, Bhat e Dawra (2000) modificado. Soluções de ácido tânico ($200\text{ }\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4), de extrato semipurificado de tanase ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4) e tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4 foram previamente incubadas a 40°C por 5 minutos em banho termostatizado com agitação interna (modelo 500/1 DE, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil). Utilizando as soluções incubadas a 40°C , o teste foi preparado com $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução de ácido tânico e $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução do extrato semipurificado de tanase. Um branco foi preparado com $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução de ácido tânico e $250\text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4 e um controle foi preparado com $250\text{ }\mu\text{L}$ da solução do extrato semipurificado de tanase e $250\text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4. O teste, o branco e o controle preparados foram incubados em banho a 40°C por 5 minutos e então, receberam respectivamente, com intervalo de 5 minutos entre cada reagente, $300\text{ }\mu\text{L}$ de solução de rodanina 0,665% em

etanol (5-(4-dimetilaminobenzilideno)-rodanina 99%, Acros Organics, Belgica), 200 μL de uma solução de hidróxido de potássio $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e 4 mL de água destilada. Após 10 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 520 nm (modelo DU®640, Beckman Coulter™, EUA) sendo o valor da absorbância calculado por $\text{Abs}_{520} = (A_{\text{teste}}) - (A_{\text{controle}} + A_{\text{branco}})$. A atividade enzimática foi avaliada por meio de uma curva de calibração de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4 e expressa como U/mg de proteína, considerando-se U como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido gálico por minuto sob as condições descritas.

3.2.2 Naringinase

A determinação da atividade enzimática da naringinase comercial foi realizada como descrito por Puri e Kalra (2005) utilizando o método de Davis (DAVIS, 1947), com modificações. O meio reacional consistiu de 0,9 mL de solução de naringina 0,08% (m/v) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) dissolvida em tampão acetato (100 mmol.L^{-1} , pH 4,0) e 0,1 mL da solução de naringinase comercial (1 mg/mL) dissolvida no mesmo tampão. O branco da reação foi composto por 1 mL do tampão acetato. A reação foi incubada a 40°C por 30 minutos em banho termostatzado (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil) e então, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 5 mL de dietilenoglicol 90% (v/v) e em seguida, adicionou-se mais 0,1 mL de solução de hidróxido de sódio $4,0 \text{ mol.L}^{-1}$. As amostras foram deixadas em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente e a intensidade da coloração amarela formada foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm (modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, Brasil). A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração de naringina em concentrações variando de 0,1 a 1,0 mg/mL em tampão acetato (100 mmol.L^{-1} , pH 4,0). Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U/mg de proteína, considerando-se U como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de naringina por minuto sob as condições descritas.

3.3 BIOTRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA

3.3.1 Polifenóis

O extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* foi avaliado quanto à biotransformação dos padrões comerciais hesperidina e naringina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), enquanto, que a naringinase comercial de *Penicillium decumbens* foi avaliada apenas na biotransformação da naringina, como critério de comparação. A biotransformação dos substratos fenólicos foi realizada empregando-se 1 mL de uma solução 5 mg/mL do substrato em tampão e 5 mg de enzima. Para hidrólise com extrato semipurificado de tanase foi utilizado tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4* e para hidrólise com a naringinase comercial foi utilizado tampão acetato 100 mmol.L⁻¹ pH 4,0. Como controle da reação e da enzima foi utilizado 1 mL de uma solução de 5 mg/mL do padrão ou da enzima, respectivamente. As amostras foram incubadas em banho termostatizado a 40°C (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos e a reação paralisada em banho de gelo por 10 minutos.

3.3.2 Suco de laranja

A biotransformação do suco de laranja foi realizada com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e com naringinase comercial de *Penicillium decumbens*, como critério de comparação. O suco de laranja concentrado foi gentilmente cedido pela Coca-Cola® Company. O suco testado foi preparado a partir de 1 grama de suco de laranja concentrado e 5 mL de tampão. Para hidrólise com a enzima naringinase comercial foi utilizado tampão acetato 100 mmol.L⁻¹ pH 4,0 e para hidrólise com extrato semipurificado de tanase foi utilizado tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4. A biotransformação foi realizada a partir de 1 mL do suco de laranja preparado e 5 mg da

* Utilizou-se pH 7,4 e 40°C na reação como continuidade do trabalho de Macedo et al. (2011), que empregou as mesmas condições na biotransformação do padrão epigallocatequina galato e de chá verde pelo extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

enzima. Como controle da reação foi utilizado 1 mL do suco de laranja preparado e, como controle da enzima foi utilizado 1 mL de uma solução de 5 mg/mL da enzima nos tampões apropriados. As amostras foram incubadas em banho termostatizado a 40°C (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos e a reação paralisada em banho de gelo por 10 minutos.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA

As amostras de suco biotransformado e controle, tampão e controle da enzima foram caracterizados quanto ao pH, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis totais e vitamina C. Com exceção da análise de pH, os resultados expressos para o suco controle e para o suco biotransformado foram determinados desconsiderando-se os resultados obtidos para o tampão e para o controle da enzima, respectivamente.

3.4.1.1 *Sólidos solúveis totais*

O teor de sólidos solúveis totais das amostras foi determinado por leitura direta em refratômetro digital (Leica AR2000, EUA) e expressos em °Brix (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.4.1.2 *Acidez total titulável e pH*

As determinações de acidez total titulável e pH foram realizadas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008) a partir das amostras diluídas 10 vezes (m/v) em água destilada. O pH da amostra diluída foi determinado em pHmetro digital Digimed (modelo DM-22 e eletrodo modelo DME-CV1, Digimed, Brasil) e a determinação da acidez foi realizada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹, tendo como indicador fenolftaleína. Os resultados de acidez total titulável para cada amostra foram expressos em % de ácido cítrico (m/m).

3.4.1.3 *Vitamina C*

O teor de ácido ascórbico foi determinado conforme método da AOAC (1997), o qual se baseia na redução do 2,6-diclorofenol indofenol pelo ácido ascórbico, e modificado por Benassi (1990), com substituição do ácido metafosfórico por ácido oxálico. Os resultados foram expressos em mg ácido ascórbico/100g de suco de laranja preparado.

3.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO

As amostras controle e biotransformadas de suco de laranja e dos padrões hesperidina e naringina tiveram o perfil fenólico avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para as amostras de suco de laranja ainda foi determinado o teor de fenólicos totais.

3.5.1 Teor de fenólicos totais no suco de laranja

A determinação de fenólicos totais foi realizada com o reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil) de acordo com o método de Singleton e Rossi (1965) modificado por Jayaprakasha et al. (2008). O suco de laranja preparado foi previamente diluído em uma solução metanol/água (8:2 v/v). O ensaio foi realizado adicionando-se 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes em água Milli-Q) a 0,2 mL de amostra diluída. Adicionou-se mais 0,8 mL de carbonato de sódio (7,5% m/v) no meio reacional e deixou-se em repouso por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas a 765 nm em espectrofotômetro (modelo DU®640, Beckman Coulter™, EUA). O branco foi composto por todos os constituintes acima citados, com exceção da amostra, substituída pela solução metanol/água. Foi realizada uma curva de calibração com ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 mL de suco.

3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as amostras de suco de laranja sofreram uma centrifugação de 10 minutos a 6000 rpm em micro centrífuga de bancada (Daigger® modelo SD) e 400 µL do sobrenadante foi dissolvido em 600 µL de água Milli-Q e então filtrados em filtros Millipore 0,45 µm. Para os padrões polifenólicos, 50 µL das amostras foram diretamente dissolvidos em 600 µL de metanol e 350 µL de água Milli-Q e então filtrados em filtros Millipore 0,45 µm.

A análise de CLAE foi realizada em um equipamento Dionex UltiMate 3000 (Alemanha) equipado com amostrador automático (WPS-3000(T)SL Analytical), bomba quaternária (LPG-3400SD) e detector de arranjo de diodos UV/VIS (DAD-3000). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna C18 Atlantis® (Waters, 5 µm, 4,6 x 150 mm). O método utilizado foi adaptado de Caridi et al. (2007) e de Mejía et al. (2010). O volume de injeção das amostras foi de 20 µl e a coluna mantida em 30°C. As análises tiveram como fase móvel solvente A (água/ácido fórmico, 99.9:0.1 v/v) e solvente B (metanol/ácido fórmico, 99.9:0.1 v/v), com vazão de 0.6 mL/min. Para as amostras de hesperidina e naringina a eluição ocorreu com o gradiente: 10% B por 5 minutos, de 10-80% B em 35 minutos, de 80-10% B em 5 minutos e 10% B por 5 minutos. Para as amostras de suco de laranja, a eluição ocorreu com o gradiente: 10% B por 5 minutos, de 10-70% B em 40 minutos, de 70-80% B em 5 minutos, de 80-10% B em 5 minutos e 10% B por 5 minutos. Os espectros foram adquiridos entre 190 e 480 nm e os cromatogramas processados a 280 nm.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O suco de laranja e os padrões hesperidina e naringina tiveram a atividade antioxidante das amostras controle e biotransformadas avaliadas pelos métodos *in vitro* de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).

3.6.1 Método do radical livre DPPH

A análise de DPPH foi realizada conforme metodologia descrita por Macedo et al. (2011) com modificações. A reação consistiu de 50 μL de amostra disposta em placas transparentes de 96 poços e 150 μL da solução de DPPH ($0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ em metanol) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras foram previamente diluídas em água destilada. Foi preparado um branco da amostra com 50 μL de amostra e 150 μL de metanol e um branco de referência com 50 μL de água e 150 μL de solução de DPPH. A reação ocorreu em leitor de microplaca Novostar Microplate Reader (BMG Labtech, Alemanha) com filtros de absorção de 520 nm e a absorbância foi lida após 60 minutos de reação. O padrão Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, Acros Organics, Belgica) foi preparado em água nas concentrações de 0-450 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e determinado conforme as condições citadas anteriormente. A atividade antioxidante foi calculada a partir da equação obtida por regressão linear das determinações de DPPH do padrão Trolox® e os resultados expressos como μmol equivalente em Trolox. L^{-1} de suco de laranja preparado ou μmol equivalente em Trolox. g^{-1} de padrão.

3.6.2 Capacidade de absorção do radical oxigênio

O método ORAC foi realizado utilizando a fluoresceína como sinalizador e o AAPH (2,2'-azinobis(2-amidinopropano)dihidrocloreto) como fonte de radical livre, conforme o método de Macedo et al. (2011) com modificações. As amostras foram preparadas em três concentrações diferentes diluídas em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4. Trolox® (Acros Organics, Belgica) foi preparado como padrão de referência em concentrações entre 1,5 e 1500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4 para a realização de curva padrão. Alíquotas de 20 μL da amostra diluída, solução de Trolox® ou tampão (branco) foram distribuídas em placa com 96 poços (cor preta e opaca) seguidas da adição de 120 μL de solução de sal sódico de fluoresceína $0,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Ecibra, São Paulo, Brasil) diluída em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 60 μL de solução do radical AAPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em

concentração 108 mg.mL^{-1} dissolvido em água destilada. A fluorescência foi monitorada a cada 56 segundos durante 75 minutos, em leitor de microplaca NovoStar Microplate Reader (BMG LABTECH, Alemanha) a 37°C e com filtro de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm. As medições foram realizadas em triplicata para cada concentração da amostra. Os valores ORAC foram baseados na diferença entre a área sob a curva de decaimento da fluorescência das amostras e do branco ($\text{AUC}_{\text{líquido}}$). Equações de regressão linear entre $\text{AUC}_{\text{líquido}}$ e concentração foram calculadas para todas as amostras. Os resultados foram expressos como μmol equivalente em Trolox. L^{-1} de suco de laranja preparado ou μmol equivalente em Trolox. g^{-1} de padrão.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e foram submetidos à análise de variância, sendo as médias entre o controle e as amostras biotransformadas comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O software estatístico utilizado foi o Minitab, versão 16.1.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e a enzima comercial naringinase de *Penicillium decumbens* utilizados nos ensaios de biotransformação foram caracterizados quanto o seu teor de proteínas totais e sua atividade específica nas condições empregadas para cada análise. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Medida da atividade enzimática específica do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e de naringinase comercial obtida de *Penicillium decumbens*.

Enzima	Atividade (U* / g enzima)	Proteínas totais (mg proteína / g enzima)	Atividade específica (U* / mg proteína)
Extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i>	93,94	318,34	0,295
Naringinase comercial de <i>Penicillium decumbens</i>	168,28	110,72	1,516

* 1U de atividade enzimática foi definida como a quantidade em μmol do substrato hidrolisado ou do produto formado (específico para cada enzima) por minuto de reação.

Conforme observado na Tabela 2, para cada ensaio de biotransformação onde foi utilizado 5 mg de enzima/mL de reação, levando-se em consideração a atividade específica de cada enzima, foram adicionadas na reação 0,469 U/mL de tanase e 0,841 U/mL de naringinase.

4.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DOS POLIFENÓIS

Os flavonoides glicosilados hesperidina e naringina da classe das flavanonas foram utilizados como substratos para a biotransformação enzimática com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e com a naringinase comercial. As reações com a naringinase comercial foram realizadas apenas com o substrato naringina e os resultados foram utilizados como critério de comparação. As reações foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-

DAD) quanto às modificações nos substratos em decorrência de uma ação enzimática e se essas modificações, quando existiram, foram capazes de aumentar o poder antioxidante dos substratos.

4.1.1 Avaliação do perfil fenólico

Com o objetivo de avaliar se o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e a naringinase comercial sofreram alguma alteração durante as condições de análise, o controle das enzimas foi avaliado por CLAE-DAD (Anexo A). Conforme o esperado, os cromatogramas apresentaram baixa intensidade dos sinais, indicando que a simples presença das enzimas no meio reacional não seria capaz de gerar qualquer modificação significativa no perfil dos cromatogramas das reações.

A atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* foi avaliada nos substratos hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosídeo) e naringina (naringenina-7-O-neohesperidosídeo), em reação durante 30 minutos a 40°C e pH 7,4. A Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos para o padrão de hesperidina (A) e para a reação da hesperidina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* (B).

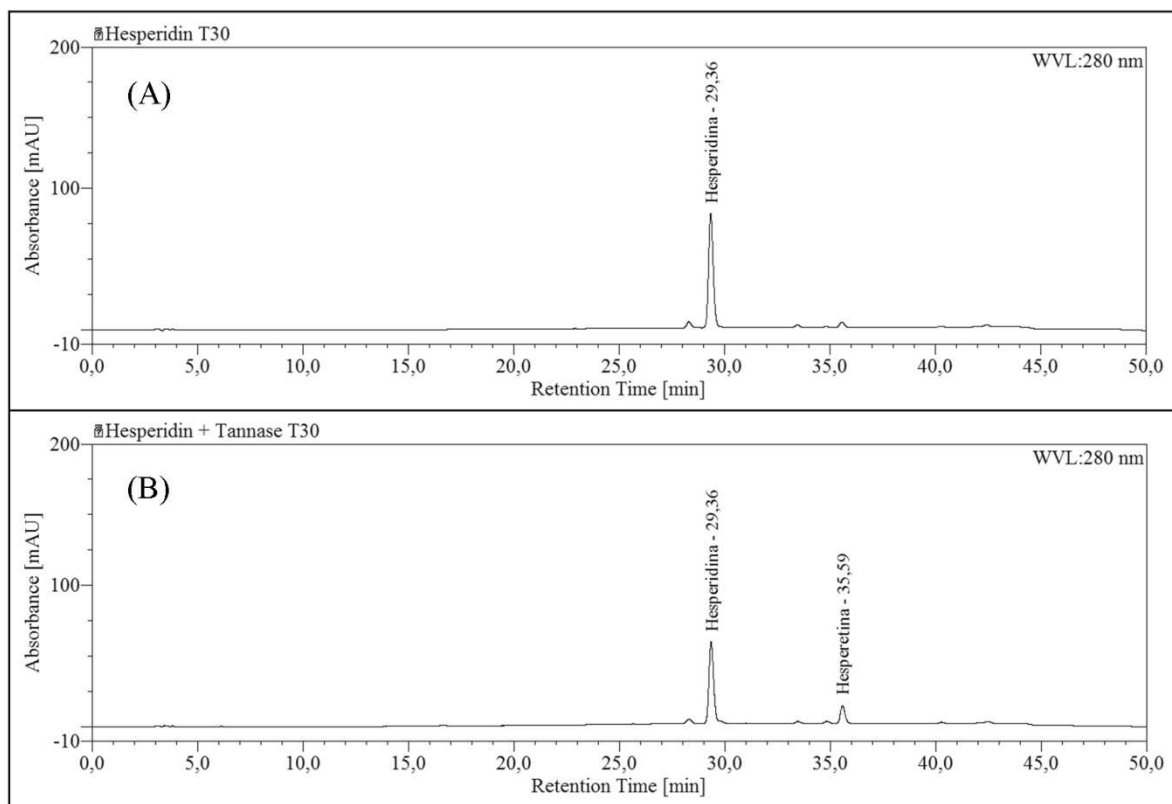


Figura 2: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação da hesperidina a 40°C em pH 7,4 durante 30 minutos (A) sem tanase e (B) com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* indicando a formação de hesperetina como produto da reação.

Através dos cromatogramas obtidos pode-se observar que há o surgimento de um pico adicional no cromatograma (Figura 2B) após a reação da hesperidina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*. Como a hesperidina consiste de uma molécula de hesperetina ligada na posição C7 por um dissacarídeo rutínose, uma possível hidrólise deste composto poderia levar a formação da aglicona hesperetina. A aglicona hesperetina também foi avaliada como substrato para atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* (Anexo B) e o cromatograma da reação não apresentou outro pico além do pico referente à hesperetina e, portanto este composto não sofreu hidrólise pelo extrato semipurificado de tanase. A Figura 3 apresenta os cromatogramas obtidos da reação da hesperidina com destaque para o espectro de absorção do produto da reação (A) e da aglicona hesperetina nas mesmas condições de reação (B).

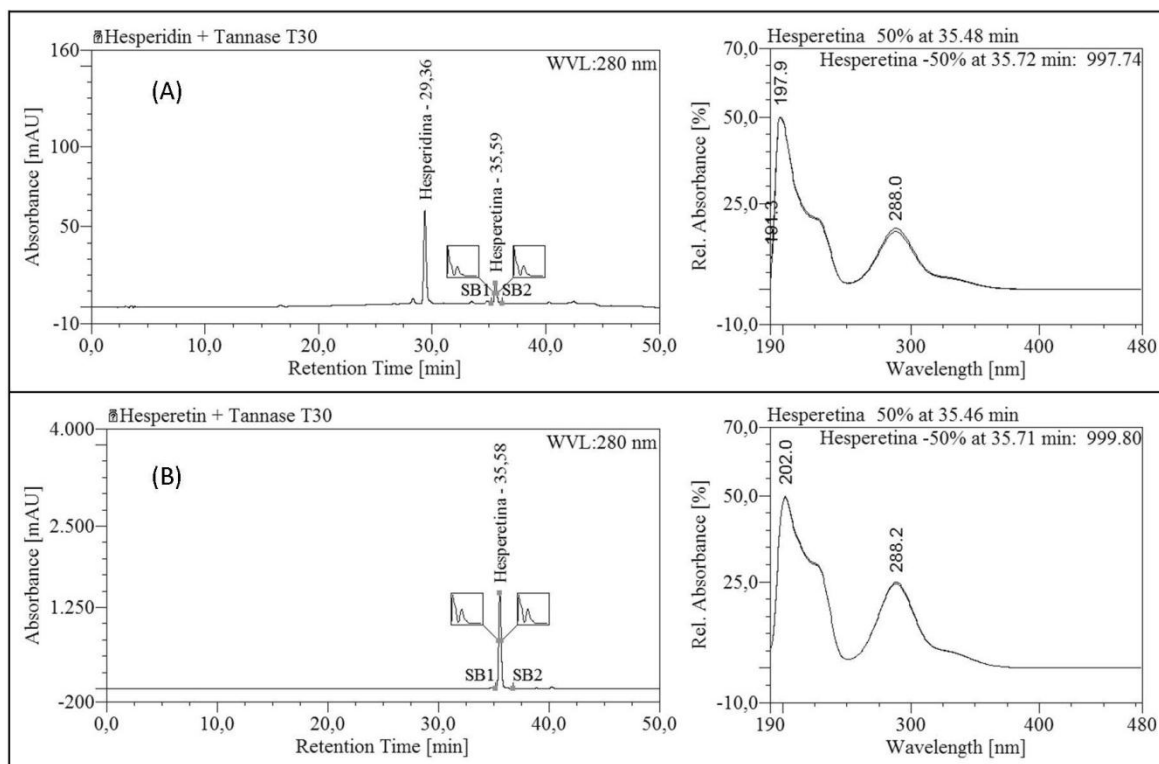


Figura 3: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de 30 minutos a 40°C em pH 7,4 (A) da hesperidina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii*, com destaque para o espectro de absorção do produto da reação e (B) do padrão de hesperetina com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*.

Comparando-se os espectros de absorção e o tempo de retenção entre o pico do produto da reação da hesperidina com extrato semipurificado de tanase (Figura 3A) e o pico da hesperetina (Figura 3B), ambos apresentaram tempo de retenção aproximado a 35,6 minutos, assim como pontos de máxima absorção nos espectros muito semelhantes, gerando forte indício de que o produto formado ao longo da reação da hesperidina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* era mesmo a aglicona hesperetina.

A Figura 4 apresenta os cromatogramas da reação de 30 minutos do padrão de naringina (A) e da reação da naringina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* (B). A naringina também possui seu dissacarídeo e aglicona unidos por meio de uma ligação glicosídica no carbono C7, no entanto, diferentemente da hesperidina, o dissacarídeo da naringina é uma neohesperidose (GATTUSO et al., 2007).

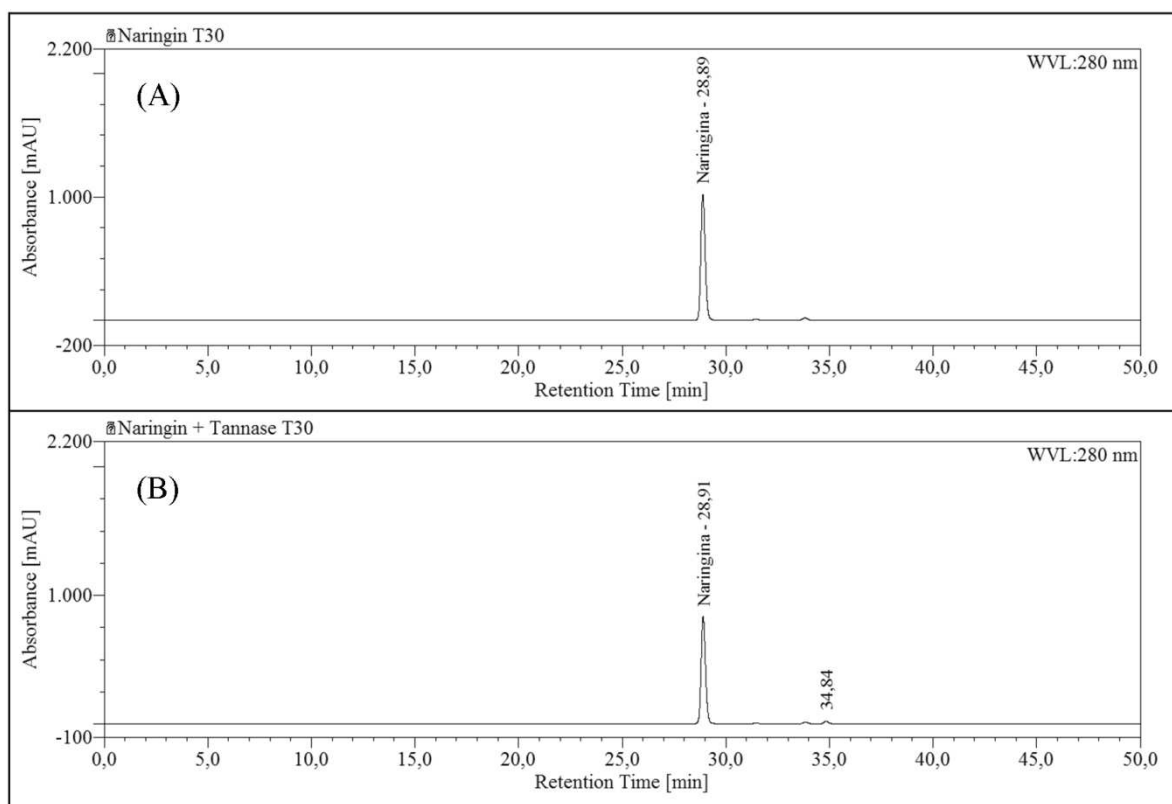


Figura 4: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação da naringina a 40°C em pH 7,4 durante 30 minutos (A) sem tanase e (B) com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* indicando a formação de um produto da reação.

Conforme observado na Figura 4B, o cromatograma da reação da naringina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* apresenta o surgimento de um pico, embora pouco representativo, indicando a formação de um produto da reação. A naringinase é um complexo enzimático com atividade α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40) e β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21) e catalisa a conversão da naringina na aglicona naringenina em um processo de duas etapas, com a formação de prunina (naringenina-7-glicosídeo) como intermediário da reação (NOROUZIAN et al., 2000). Assim, para a identificação do produto da reação da naringina com o extrato semipurificado de tanase foi necessário comparar seu tempo de retenção e espectro de absorção com o produto obtido pela hidrólise de naringina com naringinase comercial de *P. decumbens* (Figura 5).

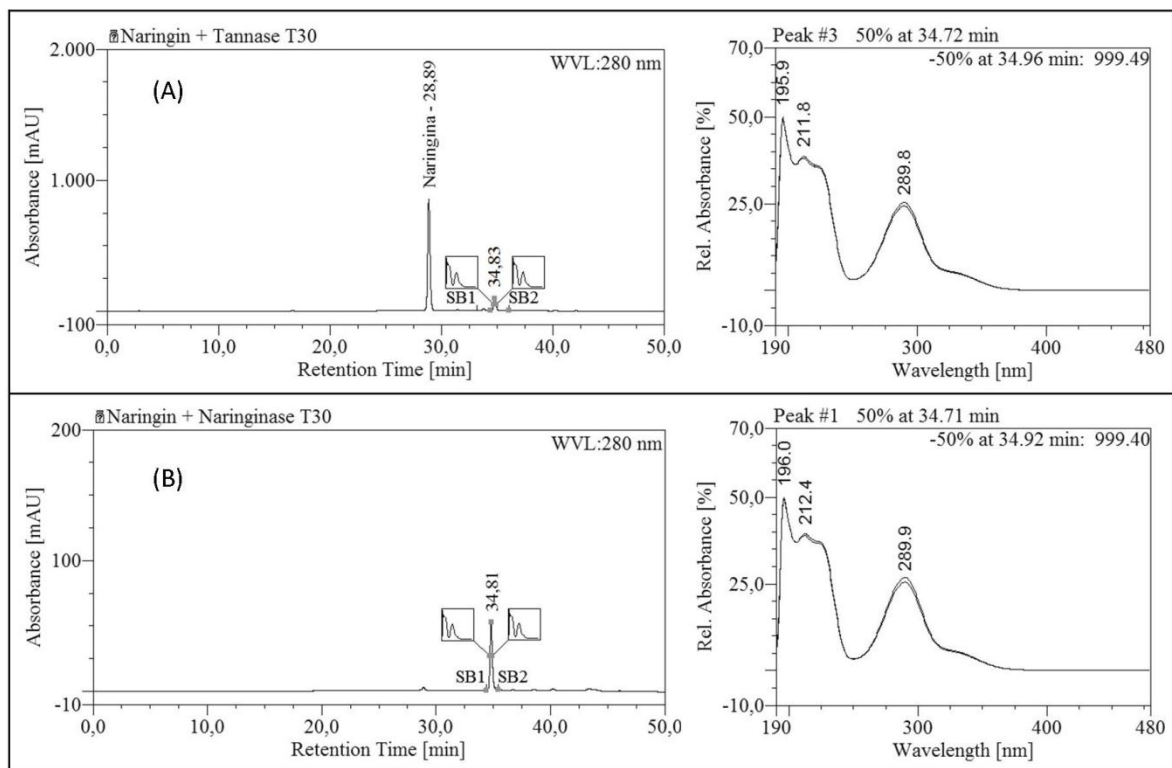


Figura 5: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação a 40°C da (A) naringina em pH 7,4 com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e (B) naringina em pH 4,0 com naringinase comercial de *Penicillium decumbens*, com destaque para os espectros de absorção dos produtos das reações.

A partir da Figura 5B, observa-se que a naringina foi praticamente toda hidrolisada pela naringinase comercial nas condições empregadas de reação, sendo a aglicona naringenina o produto final da reação. Comparando-se o tempo de retenção e o espectro de absorção entre os produtos obtidos da reação da naringina com o extrato semipurificado de tanase (Figura 5A) e com a naringinase comercial (Figura 5B), verifica-se que os resultados foram muito semelhantes entre os tratamentos, fornecendo forte indício de que também é a naringenina o produto gerado da reação da naringina com extrato bruto de tanase de *P. variotii*.

A literatura apresenta a tanase como uma enzima capaz de atuar em substratos com pelo menos dois grupos OH fenólicos no componente ácido, sendo reportada na hidrólise de taninos hidrolisáveis e ainda epigallocatequina galato, epicatequina galato e ácido clorogênico (LEKHA; LONSANE, 1997). A capacidade da tanase em catalisar a

deglicosilação de flavanonas como a naringina e a hesperidina é um relato inédito em toda literatura especializada consultada ao longo deste trabalho. No entanto, em estudos de Ramírez-Coronel et al. (2003) uma tanase purificada obtida de *Aspergillus niger* apresentou atividade β -glicosídica, sendo capaz de romper a ligação β -1,4 do dissacarídeo celobiose. Diferentemente do que acontece na hidrólise de naringina por naringenase comercial (NOROUZIAN et al., 2000), onde o processo ocorre em duas etapas devido a presença de duas atividades enzimáticas (α -L-ranmosidase e β -D-glicosidase), no presente estudo, o extrato semipurificado de tanase aparentemente foi capaz de remover o dissacarídeo das flavanonas em uma única etapa, visto que nenhum dos cromatogramas das reações (Figura 2B e Figura 4B) apresentou outros picos que pudessem indicar a formação de um intermediário da reação. A Figura 6 apresenta a possível atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* nas flavanonas estudadas, indicando como produtos das reações as agliconas e os dissacarídeos obtidos a partir da hidrólise dos substratos em uma única etapa.

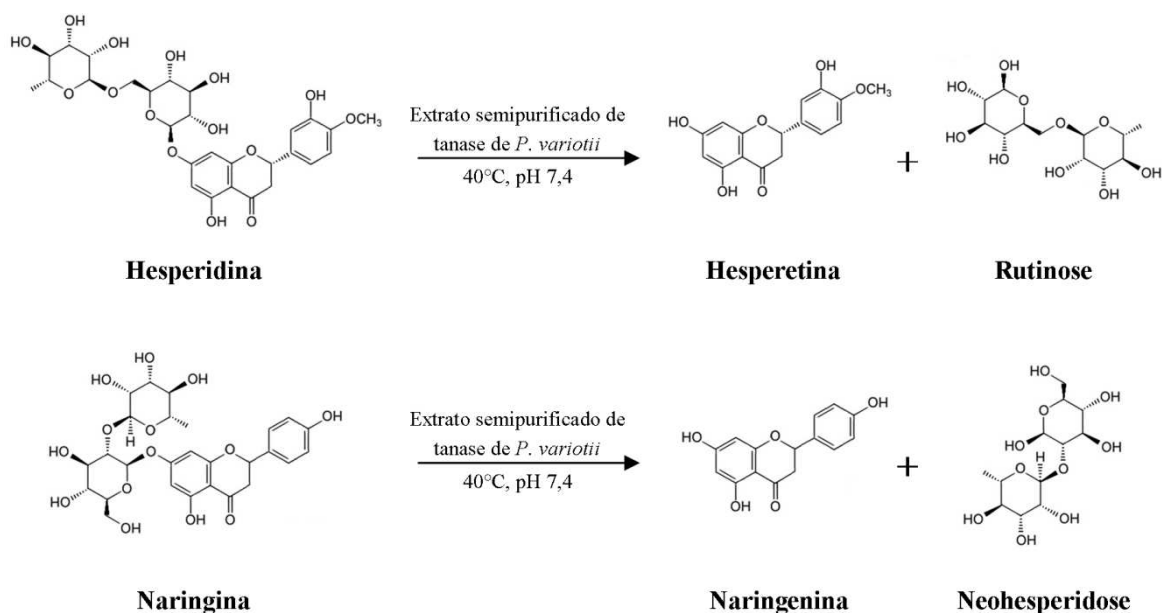


Figura 6: Indicação de atuação do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* nas flavanonas hesperidina e naringina a 40°C e tampão fosfato pH 7,4.

4.1.2 Atividade antioxidante

O efeito do extrato semipurificado de tanase e da naringinase comercial na alteração da atividade antioxidante da hesperidina e naringina foi avaliado pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e ORAC. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Equivalentes em Trolox e faixa de linearidade dos resultados pelo método ORAC e equivalentes em Trolox pelo método de sequestro de radicais DPPH realizados para os polifenóis hesperidina e naringina controle e biotransformado.

Amostra	ORAC				DPPH	
	Equiv. Trolox (μmol/g amostra)	Concentração amostra (mg/mL)	Coef. angular	Coef. linear	r²	Equiv. Trolox (μmol/g amostra)
Hesperidina pH 7,4	2333 ± 202 ^b	0,04 - 0,08	68,5	1,3	0,99	55 ± 33 ^b
Hesperidina pH 7,4 + Tanase	6552 ± 1253 ^a	0,04 - 0,08	111,0	8,1	0,96	865 ± 91 ^a
Hesperetina pH 7,4	5241 ± 343 ^a	0,04 - 0,08	111,5	6,5	0,99	931 ± 4 ^a
Naringina pH 7,4	7958 ± 610 ^b	0,04 - 0,08	247,5	3,6	0,95	67 ± 2 ^b
Naringina pH 7,4 + Tanase	9955 ± 887 ^a	0,04 - 0,08	293,4	5,4	0,99	428 ± 10 ^a
Naringina pH 4,0	9285 ± 1119 ^a	0,04 - 0,08	240,0	6,9	0,99	59 ± 9 ^b
Naringina pH 4,0 + Naringinase	11051 ± 798 ^a	0,04 - 0,08	342,8	5,0	0,99	126 ± 3 ^a

Os resultados apresentados são médias (n = 3) $\pm$ DP, e aqueles com letras diferentes são significativamente diferentes, com p < 0,05.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3, a atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* gerou aumento da capacidade antioxidante dos produtos biotransformados em comparação com o substrato sem reação. A hesperidina biotransformada apresentou um aumento impressionante do poder antioxidante, atingindo 180% pelo método ORAC e 1470% pelo método de sequestro dos radicais DPPH. Além

disso, os resultados de atividade antioxidante obtidos com a hesperidina biotransformada não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) dos resultados obtidos com a aglicona hesperetina, indicando para as duas amostras que a hesperetina possui atividade antioxidante superior ao seu glicosídeo hesperidina.

A biotransformação da naringina com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* resultou em um acréscimo de 25% na capacidade antioxidante do meio reacional pelo método ORAC, e de 538% pelo método de sequestro dos radicais DPPH. A naringina biotransformada pela naringinase comercial, isto é, a aglicona naringenina, visto que a naringina foi totalmente hidrolisada nas condições de reação, também apresentou maior atividade antioxidante que sua forma glicosilada em aproximadamente 110% pelo método de sequestro dos radicais DPPH, no entanto, o método ORAC não indicou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Mesmo assim, a biotransformação enzimática dos flavonoides em suas agliconas por ação de ambas as enzimas testadas neste trabalho mostrou ser um ótimo meio para o aumento da atividade antioxidante destes compostos.

A literatura apresenta três principais critérios químicos para estabelecer a capacidade antioxidante dos flavonoides (MARTÍNEZ-FLÓRES et al., 2002). Esses critérios são: a presença do grupo orto-dihidroxi no anel B que confere uma maior estabilidade à forma radicalar; a ligação dupla conjugada com a função 4-oxo do anel C e; os grupos hidroxilo nas posições C3 e C5 do anel A com a função 4-oxo do anel C (BORS et al., 1990 *apud* SILVA et al., 2002). Assim, para os compostos com apenas um grupo hidroxilo no anel B, como as flavanonas, os grupos hidroxilo no anel A são importantes para a atividade antioxidante destes compostos (RICE-EVANS, MILLER E PAGANGA (1996).

A literatura em geral mostra que uma glicosilação na estrutura do flavonoide raramente confere uma vantagem antioxidante sobre a forma aglicona, visto que a O-glicosilação pode gerar efeitos estéricos que perturbam a planaridade destes compostos e interferem na capacidade de deslocalização eletrônica (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Em estudos de Rice-Evans, Miller e Paganga (1996), a capacidade antioxidante dos flavonoides avaliada pelo ensaio de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) mostrou que a glicosilação na posição C7 de flavanonas, tem uma forte

influência supressora sobre a atividade antioxidante destes compostos quando comparados com suas agliconas. Isso também foi observado para a glicosilação na posição C3 da aglicona quercetina que apresentou maior capacidade antioxidante pelo método TEAC do que seu derivado glicosídico rutina (quercetina-3-rutinosídeo).

Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), durante o desenvolvimento e validação do método ORAC utilizando fluoresceína, também avaliaram a atividade antioxidante de diferentes flavonoides e obtiveram maiores valores ORAC (expressos em equivalentes em Trolox) com a aglicona quercetina, seguida pela quercitrina (quercetina-3-ramnosídeo) e rutina, respectivamente. Em trabalho de Silva (2011), os padrões comerciais dos flavonoides glicosil-hesperidina, hesperidina, rutina e quercetina também tiveram a atividade antioxidante avaliada pelo método ORAC e os resultados mostraram que a forma aglicona quercetina apresentou maior atividade antioxidante do que sua forma glicosilada rutina, assim como a hesperidina que apresentou maior atividade antioxidante do que seu derivado glicosilado glicosil-hesperidina.

Pode-se ainda observar que as atividades antioxidantes das amostras dependeram do método utilizado, sendo que os maiores valores de equivalente em Trolox foram obtidos para as amostras avaliadas pelo método ORAC. Esses resultados sofrem influência do princípio de cada método, e estes diferem bastante entre si. O método ORAC baseia-se em uma reação de transferência de um átomo de hidrogênio, enquanto que o método de sequestro de radicais DPPH baseia-se na reação de transferência de elétrons (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Além disso, os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio como o ORAC, normalmente ocorrem com radicais peroxila altamente reativos, e sendo o DPPH um radical nitrogênio bastante estável, muitos antioxidantes que reagem rapidamente com os radicais peroxila podem reagir lentamente ou até mesmo serem inertes ao DPPH (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Assim, quase todos os estudos sobre atividade antioxidante mostram diferenças nos resultados entre diferentes métodos analíticos, de modo que é recomendado sempre o uso de mais de um método para uma mesma amostra (XU et al., 2009).

4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DO SUCO DE LARANJA

Sendo os flavonoides glicosilados hesperidina e naringina bastante característicos de frutas cítricas, a atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* também foi avaliada na matriz alimentar suco de laranja. Como critério de comparação, o suco de laranja também sofreu reação com a naringinase comercial de *P. decumbens*. Os resultados obtidos encontram-se a seguir.

4.2.1 Caracterização do suco de laranja

A caracterização do suco de laranja controle (sem adição da enzima) e do suco de laranja biotransformado foi realizada quanto o teor de sólidos solúveis totais, pH, acidez total titulável e vitamina C. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Caracterização do suco de laranja** controle e biotransformado.

Amostras	Sólidos solúveis totais* (°Brix)	pH*	Acidez total titulável* (% ácido cítrico m/m)	Vitamina C* (mg ácido ascórbico/100g)
Suco de Laranja pH 7,4	10,5 ± 0,1 ^a	4,72 ± 0,03 ^a	0,71 ± 0,01 ^a	44,58 ± 1,95 ^a
Suco de Laranja pH 7,4 + Tanase	10,3 ± 0,2 ^a	4,73 ± 0,02 ^a	0,73 ± 0,02 ^a	41,41 ± 3,10 ^a
Suco de Laranja pH 4,0	11,2 ± 0,2 ^a	3,82 ± 0,03 ^a	0,66 ± 0,01 ^b	45,64 ± 1,06 ^a
Suco de Laranja pH 4,0 + Naringinase	11,3 ± 0,2 ^a	3,84 ± 0,00 ^a	0,74 ± 0,02 ^a	43,37 ± 1,24 ^b

*Os resultados apresentados são médias (n = 3) ± DP, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com p < 0,05.

**Os resultados foram expressos a partir do suco de laranja preparado em tampão.

Conforme a Tabela 4, para o suco de laranja em pH 7,4 os parâmetros sólidos solúveis totais, pH, acidez total titulável e vitamina C não apresentaram diferença significativa (p<0,05) entre o suco controle e o suco biotransformado por extrato semipurificado de tanase. Resultados diferentes para alguns parâmetros foram observados

no tratamento do suco em pH 4,0. Para o suco controle e o suco biotransformado com naringinase comercial, as médias referentes à acidez total titulável e teor de vitamina C apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. O teor de vitamina C decaiu 5% com o tratamento enzimático e o parâmetro acidez total titulável aumentou 12,1% no suco biotransformado. Em relação ao teor de vitamina C, o tratamento enzimático pouco proporcionou a degradação deste composto e, portanto não afetaria a participação desta bebida como fonte diária de vitamina C na dieta.

Rout e Banerjee (2006) avaliaram a ação de uma tanase parcialmente purificada na redução do amargor do suco de romã proveniente da grande concentração de taninos nesse suco e, com o objetivo de verificar alterações na qualidade em decorrência do tratamento enzimático, o suco foi submetido a análises de teor de vitamina C, pH, acidez titulável, viscosidade, carboidratos e proteínas totais. Assim como o observado nesse estudo, os autores verificaram que o tratamento do suco de romã com a tanase semipurificada não promoveu diferença significativa nos parâmetros avaliados em relação ao suco controle, com exceção do teor de carboidratos totais que foi superior no suco de romã enzimaticamente tratado.

4.2.2 Avaliação do perfil fenólico

O suco de laranja também foi avaliado quanto às alterações no teor de fenólicos totais em decorrência da biotransformação enzimática. Os resultados para as amostras de suco de laranja controle e tratadas com extrato semipurificado de tanase e naringinase comercial encontram-se na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Teor de fenólicos totais do suco de laranja** controle e biotransformado.

Amostras	Fenólicos Totais* (equiv. mg ácido gálico/100mL)
Suco de Laranja pH 7,4	62,02 ± 2,48 ^b
Suco de Laranja pH 7,4 + Tanase	72,45 ± 1,08 ^a
Suco de Laranja pH 4,0	62,76 ± 1,45 ^b
Suco de Laranja pH 4,0 + Naringinase	66,40 ± 1,61 ^a

*Os resultados apresentados são médias (n = 3) ± DP, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com p < 0,05.

**Os resultados foram expressos a partir do suco de laranja preparado em tampão.

Conforme observado na Tabela 5, tanto o suco de laranja tratado com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* quanto o suco de laranja tratado com a naringinase comercial apresentaram aumento no teor de fenólicos totais com relação ao controle de 16,8% e 5,8%, respectivamente. Sabe-se que a vitamina C também é capaz de reduzir o reagente de Folin utilizado na determinação de fenólicos totais e, portanto este valor é superestimado em matrizes que contém ácido ascórbico. Aproximadamente 40% do valor estimado para fenólicos totais são decorrentes da vitamina C e somente a fração restante é proveniente das flavanonas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Neste trabalho, tendo visto que o teor de vitamina C ou sofreu redução ou não sofreu alteração no suco de laranja biotransformado, o aumento observado no teor de fenólicos totais não é proveniente da vitamina C, mas pode estar relacionado com a liberação e hidrólise dos flavonoides da matriz. O suco de laranja não é considerado uma fonte muito rica em polifenóis (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000), mas como os ácidos fenólicos e as flavanonas são os dois principais grupos de compostos fenólicos encontrados em sucos de laranja (KELEBEK et al., 2009) e sabendo que o extrato bruto de tanase e a naringinase comercial são capazes de hidrolisar hesperidina e naringina em suas agliconas, a hidrólise destes compostos da matriz pode ter influenciado o teor de fenólicos totais das amostras.

Em estudos de Oliveira et al. (2006), com a obtenção de suco de maçã a partir de liquefação enzimática por enzimas pectinolíticas, foi encontrado um aumento de 40% no

teor de compostos fenólicos para o suco obtido por liquefação enzimática em comparação com o suco obtido por prensagem, provavelmente proveniente do aumento da liberação dos compostos fenólicos a partir da degradação enzimática da parede celular. No estudo de Nam et al. (2011), a fermentação do *meju*, um derivado fermentado de soja, por *Aspergillus oryzae* NL 5 mostrou um aumento de concentração de compostos fenólicos totais nos produtos fermentados, relacionado ao acúmulo das formas livres das isoflavonas (agliconas). Em trabalho de Randhir, Vatter e Shetty (2004), onde foi avaliada a fermentação de fava (*Vicia fava*) com o micro-organismo *Rhizopus oligosporus*, foi observada uma correlação entre a atividade de β -glicosidase fúngica com o aumento do teor de fenólicos totais, sugerindo que a enzima desempenhou um papel importante na liberação das agliconas e ainda como consequência, aumentou a atividade antioxidante dos substratos.

Para a avaliação do perfil fenólico do suco de laranja por CLAE-DAD, este sofreu prévia identificação dos compostos naringina, hesperidina e hesperetina em sua composição baseada no tempo de retenção e espectro de absorção desses compostos, e para este fim, foram adicionadas individualmente sobre a amostra de suco, soluções contendo esses padrões para que os picos correspondentes pudessem ser identificados (Anexo C).

Assim, para avaliar a extensão da biotransformação enzimática no perfil polifenólico da matriz estudada, as amostras de suco de laranja controle e biotransformados foram avaliadas por CLAE-DAD. Os cromatogramas obtidos do suco de laranja sem biotransformação (suco de laranja controle), do suco de laranja tratado com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e do suco de laranja tratado com a naringinase comercial de *P. decumbens* (para fins de comparação), estão representados na Figura 7, respectivamente pelas denominações A, B e C. Com o objetivo de verificar se as condições de reação poderiam provocar alguma modificação no perfil cromatográfico do suco de laranja, o suco sem nenhum tratamento também foi avaliado por CLAE-DAD (Anexo D) e conforme o esperado, nenhuma modificação significativa foi observada entre o suco sem tratamento e o suco tratado durante 30 minutos a 40°C (suco de laranja controle).

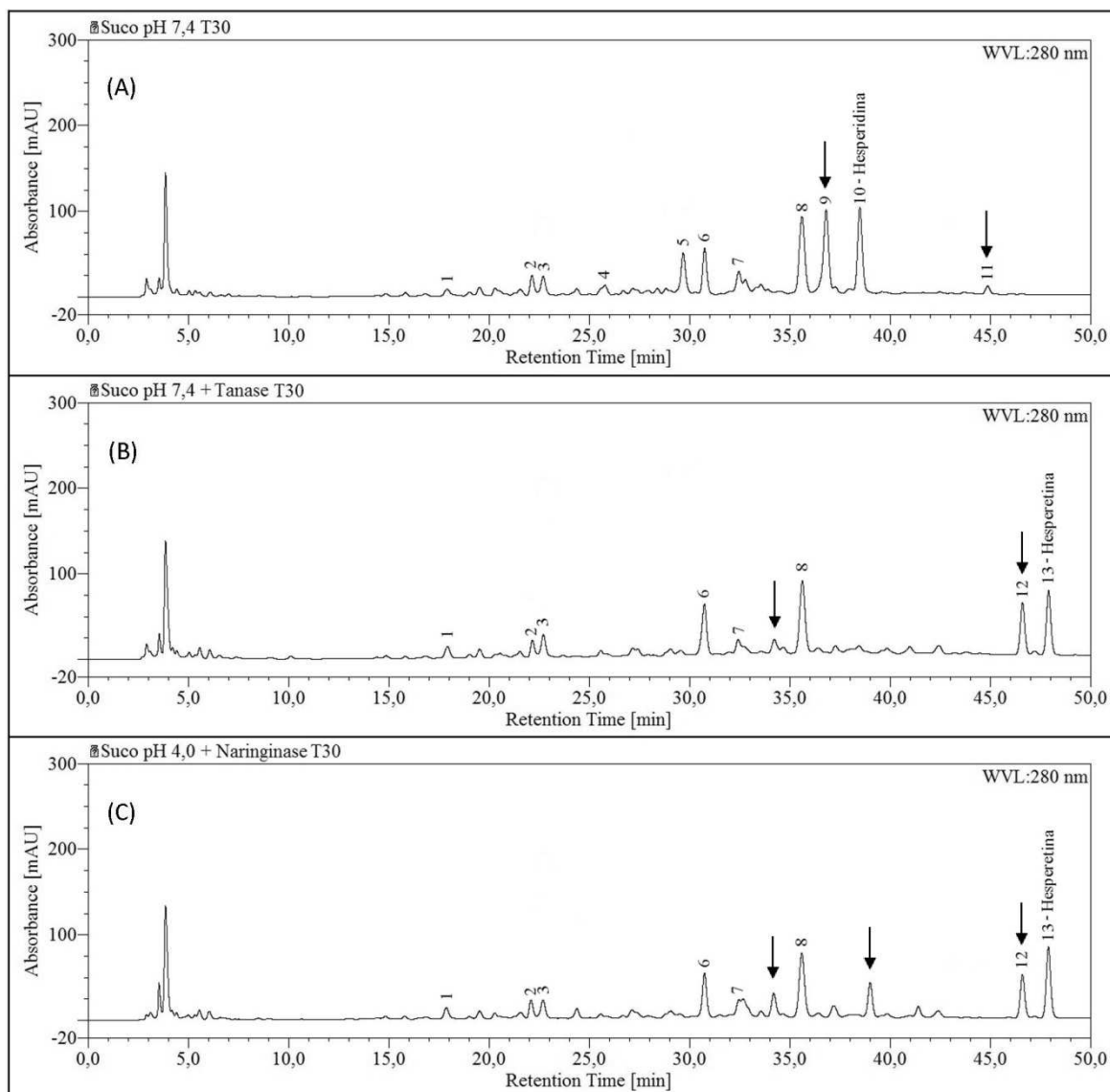


Figura 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação a 40°C da (A) amostra de suco de laranja em pH 7,4, (B) da amostra de suco de laranja em pH 7,4, com o extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e (C) da amostra de suco de laranja em pH 4,0 tratado com a naringinase comercial de *Penicillium decumbens*.

Apesar da necessidade de estudos analíticos mais aprofundados para caracterização detalhada das modificações observadas no perfil fenólico do suco de laranja após biotransformação enzimática, observa-se que para ambos os sucos biotransformados (Figura 7B e 7C) houve o desaparecimento do pico de número 10 no suco controle e o surgimento dos picos de número 12 e 13 e de um pico entre os picos de números 7 e 8. O pico representado pelo número 12 e o pico visualizado entre os picos de número 7 e 8 nas

Figuras 7B e 7C não puderam ser identificados. No entanto, conforme cromatogramas do Anexo C, os picos representados pelos números 10 na Figura 7A e 13 nas Figuras 7B e 7C indicaram representar respectivamente, o pico da hesperidina e hesperetina, mostrando que assim como ocorreu a hidrólise do padrão comercial hesperidina pelo extrato semipurificado de tanase, também foi verificado a hidrólise da hesperidina para a sua forma aglicona hesperetina no suco de laranja tratado com as enzimas empregadas neste estudo. O suco de laranja avaliado não apresentou em sua composição o composto naringina (Anexo C, Figura C).

Os compostos referenciados como picos 5, 9 e 11 no suco controle (Figura 7A) não foram identificados, mas também sofreram redução de concentração pela ação das enzimas empregadas neste estudo (Figuras 7B e 7C). Analisando a hidrólise do suco de laranja com a naringinase comercial (Figura 7C), observa-se a existência de outro pico entre os picos de número 8 e 12 do cromatograma, que não foi visualizado no cromatograma com a tanase semipurificada (Figura 7B), indicando que o extrato de tanase pode também ter hidrolisado este composto. Portanto, a enzima naringinase agiu, muitas vezes, sobre os mesmos compostos que a tanase, porém não na mesma extensão, ou com a mesma eficiência. Assim, o extrato semipurificado de tanase mostrou possuir uma ação menos específica, ou melhor, mais ampla, do que a enzima comercial naringinase. Esse fato a torna uma opção interessante para aplicação em matrizes alimentares com composição rica em polifenóis, nos quais a enzima pode atuar de diferentes maneiras na biotransformação.

4.2.3 Atividade antioxidante

Uma vez caracterizados os perfis polifenólicos do suco de laranja controle e biotransformado, as amostras foram avaliadas quanto a possíveis modificações na sua capacidade antioxidante em decorrência da biotransformação. Conforme observado nos perfis cromatográficos do suco de laranja tratado com o extrato semipurificado de tanase e com a naringinase comercial, a ação da tanase foi mais abrangente e poderia significar alterações mais significativas na capacidade antioxidante destas amostras. A Tabela 6, a

seguir, apresenta os resultados obtidos pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e ORAC para as amostras de suco de laranja controle e biotransformadas com extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* e naringinase comercial de *P. decumbens*.

Tabela 6: Equivalentes em Trolox e faixa de linearidade dos resultados pelo método ORAC e equivalentes em Trolox pelo o método de sequestro de radicais DPPH realizados para os sucos de laranja* controle e biotransformado.

Amostra	ORAC					DPPH
	Equiv. Trolox ($\mu\text{mol/L}$ suco)	Concentração da amostra (% v/v)	Coef. angular	Coef. linear	r^2	Equiv. Trolox ($\mu\text{mol/L}$ suco)
Suco de Laranja pH 7,4	21279 ± 1969^b	1,6 - 2,4	409,4	6,8	0,99	6100 ± 472^b
Suco de Laranja pH 7,4 + Tanase	33148 ± 2323^a	1,6 - 2,4	782,8	7,8	0,99	10349 ± 320^a
Suco de Laranja pH 4,0	18750 ± 1294^a	1,6 - 2,4	445,0	4,4	0,99	5319 ± 185^a
Suco de Laranja pH 4,0 + Naringinase	20941 ± 1563^a	1,6 - 2,4	469,0	5,4	0,99	4221 ± 731^a

Os resultados apresentados são médias ($n = 3$) $\pm$ DP, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com $p < 0,05$.

*Os resultados foram expressos a partir do suco de laranja preparado em tampão.

Conforme observado na Tabela 6, apesar da reação do suco de laranja com naringinase comercial apresentar um aumento de 5,8% no teor de fenólicos totais, nenhum dos métodos de atividade antioxidante testados mostrou diferença na capacidade antioxidante em decorrência da biotransformação. Já nas amostras de suco de laranja tratadas com o extrato semipurificado de tanase, onde o aumento do teor de fenólicos totais foi de 16,8%, foi verificado um aumento significativo na capacidade antioxidante da amostra tratada, tanto pelo método ORAC (50% de aumento), quanto pelo método de sequestro dos radicais DPPH (70% de aumento). Estes resultados corroboram a ideia de que o extrato semipurificado de tanase atuou de forma mais ampla e expressiva na biotransformação dos polifenóis do suco de laranja do que a naringinase.

Em estudo de Park et al. (2001), farinha de soja desengordurada e processada termicamente a 121°C tiveram suas isoflavonas extraídas e reagidas com β -glicosidase fúngica e os resultados mostraram que os tratamentos combinados quase converteram totalmente as isoflavonas para a forma aglicona, com maior atividade antioxidante pelo ensaio de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico. Em um estudo com bagaço de oxicoco ou *cranberry*, Vatter e Shetty (2003) investigaram os efeitos da fermentação em estado sólido com fungo *Lentinus edodes* neste substrato e, além de um aumento no conteúdo fenólico durante o período de fermentação, ainda foi observado um aumento na atividade antioxidante do bagaço pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e da inibição da oxidação do β -caroteno. Em estudo de Silva (2011) a biotransformação dos flavonoides dos sucos de laranja e limão pelas enzimas comercialmente disponíveis hesperidinase, naringinase e glicosidase, mostraram um aumento significativo na atividade antioxidante das amostras após as reações de biotransformação. A análise em espectrofotômetro de massas das amostras biotransformadas indicou a ação das enzimas na hidrólise das frações glicosídicas dos flavonoides, gerando compostos de interesse com maior capacidade antioxidante.

Assim como o observado na análise da biotransformação dos padrões comerciais de naringina e hesperidina, onde as agliconas apresentaram maior atividade antioxidante do que as formas glicosiladas, o suco de laranja biotransformado pelo extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* também apresentou maior atividade antioxidante e, como visto anteriormente, isso se deve em boa parte à liberação dos compostos fenólicos de seus conjugados. Segundo Rapisarda et al. (1999), a atividade antioxidante do suco de laranja não é uma propriedade de um único composto fitoquímico, e pode ser atribuída, em parte significativa, ao seu teor de fenóis totais, enquanto que o ácido ascórbico parece desempenhar um papel menor. No entanto, mesmo o suco de laranja biotransformado com naringinase comercial tendo apresentado um aumento de 5,8% no teor de fenólicos totais, o decréscimo de 5% no teor de vitamina C pode ter sido fundamental em neutralizar o aumento da atividade antioxidante gerado pela formação de agliconas no suco biotransformado. Assim, a tanase semipurificada testada tem grande potencial de aplicação

em processos de biotransformação de alimentos ricos em polifenóis, sendo capaz de modificar estes compostos de forma ampla e aumentar suas propriedades antioxidantes.

5 CONCLUSÕES

O extrato semipurificado da tanase de *Paecilomyces variotii* foi capaz de modificar o perfil cromatográfico da composição polifenólica do suco de laranja e de atuar em naringina e hesperidina na remoção dos seus glicosídeos. Além disso, a biotransformação enzimática dos substratos analisados proporcionou um aumento da atividade antioxidante *in vitro* destes compostos. A naringinase comercial de *Penicillium decumbens* também foi capaz de atuar nas matrizes estudadas, no entanto, os resultados obtidos com o extrato semipurificado de tanase foram muito mais significativos no aumento da atividade antioxidante *in vitro* destes substratos. Alterações na metodologia como diluir o suco concentrado em água ao invés de tampão, poderia aproximar ainda mais esta técnica de uma aplicação industrial. Assim, a biotransformação enzimática de polifenóis em matrizes alimentares aumentou a atividade antioxidante destes compostos e apresenta grande potencial para a produção de alimentos com maiores atividades funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AHERNE, A.S.; O'BRIEN, N.M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, n. 18, p. 75-81, 2002.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997. 1141 p.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1832-1837, 2007.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. de. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 228-233, 2008.

BENASSI, M.T. **Análise dos efeitos dos diferentes parâmetros na estabilidade da vitamina C em vegetais processados**. 159f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1990.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, 1997.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of *citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BIASI, F. et al. Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 31, p. 4851-4865, 2011.

BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BORS, W. et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343-355, 1990 *apud* SILVA, M.M. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v. 36, n. 11, p. 1219-1227, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARIDI, D. et al. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 105, p. 691-699, 2007.

CORREA NETO, R.S.; FARIA, J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 153-161, 1999.

DAVIS, D.W. Determination of flavonones in citrus juice. **Analytical Chemistry**, v. 19, p. 46-48, 1947.

DE MEJÍA, E.G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 23-34, 2010.

ERLUND, I. et al. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2, p. 235-241, 2001.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 851-874, 2004.

ESCARPA, A.; GONZALES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

GARDNER, P.T. et al. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471-474, 2000.

GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, p. 1641-1673, 2007.

GEORGETTI, S.R. et al. Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 459-466, 2009.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HOLLMAN, P.C.H. et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1276-1282, 1995.

HOLLMAN, P.C.H. et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Letters**, v. 418, p. 152-156, 1997.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAYAPRAKASHA G.K. et al. Radical scavenging activities of rio red grapefruits and sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4484-4494, 2008.

KANAZE, F.I. et al. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 472-477, 2007.

KELEBEK, H. et al. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 187-192, 2009.

KLIMCZAK, I. et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 313-322, 2007.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, Filippo (Ed.). **Phytochemistry: Advances in Research**. India : Research Signpost, c. 2, p. 23-67, 2006.

LEE, H.S.; COATES, G.A. Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. **Food Chemistry**, v. 65, p. 165-168, 1999.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Production and application of tannin acyl hidrolase: state of the art. **Advances in Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

MACEDO, G.A; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 833-838, 2005.

MACEDO, J.A. et al. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, p. 491-497, 2011.

MANACH, C. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 235-242, 2003.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTINEZ-FLOREZ, S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MIGUEL, M.G. et al. Ascorbic acid and flavanone glycosides in citrus: relationship with antioxidant activity. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, n. 2, p. 222-227, 2009.

NAM, D.H. et al. Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. H194-H200, 2011.

NEVES, M.F. (Coord.) et al. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf. Acesso em: 19 abr. 2012.

NIELSEN, I.L.F. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 404-408, 2006.

NOROUZIAN, D. et al. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 16, p. 471-473, 2000.

OLIVEIRA, M.C.S. et al. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 906-915, 2006.

OU, B. et al. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PARK, Y.K. et al. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food Science-South Korea**, v. 34, n. 4, p. 14-19, 2001.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PURI, M.; KALRA, S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 753-758, 2005.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1439-1452, 2006.

RAMÍREZ-CORONEL, M.A. et al. A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. **Microbiology**, v. 149, p. 2941-2946, 2003.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 235-244, 2004.

RAPISARDA, P. et al. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4718-4723, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, 1997.

ROMIER, B. et al. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 7, p. 363-378, 2009.

ROUT, S.; BANERJEE, R. Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5 (suppl.), p. 346-350, 2006.

SAIJA, A. et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SHARMA, S.; BHAT, T.K.; DAWRA, R.K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 85-89, 2000.

SILVA, C.M.G. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de bebidas contendo polifenóis biotransformados**. Bragança Paulista, SP: Universidade São Francisco, 2011. 88p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SPENCER, J.P.E. Classification, dietary sources, absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. In: Awad, A.B.; Bradford, P.G. **Nutrition and Cancer Prevention**. Boca Raton: Taylor & Francis. 2006.

STELLA, S.P. et al. Antioxidant activity of commercial ready-to-drink orange juice and nectar. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, 2011.

TRIPOLI, E. et al. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. **Food Chemistry**, v. 104, p. 466-479, 2007.

VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 367-379, 2003.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

XU, G. et al. Composition of major flavanone glycosides and antioxidant capacity of three citrus varieties. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, p. 453-469, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

Pelo que se tem conhecimento, este trabalho apresentou pela primeira vez a capacidade do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* em atuar na hidrólise do flavonol rutina e das flavanonas hesperidina e naringina, indicando que além das atividades esterásicas e depsídicas já descritas na literatura para tanase, o extrato enzimático atuou diretamente na ligação entre a aglicona e o dissacarídeo dos flavonoides estudados, indicando uma provável atividade de diglicosidase.

Além disso, o extrato semipurificado da tanase de *P. variotii* foi capaz de modificar o perfil polifenólico do suco de laranja e consequentemente proporcionar um aumento da atividade antioxidante *in vitro* dessa matriz. As amostras dos padrões hesperidina e naringina hidrolisadas pelo extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* também apresentaram maior atividade antioxidante do que o controle, e de acordo com o encontrado na literatura, uma glicosilação conferiu uma desvantagem antioxidante em relação à forma aglicona do flavonoide. Assim, este trabalho revela novos substratos para a tanase de *P. variotii* e confirma que a biotransformação é uma boa estratégia para melhorar a atividade antioxidante *in vitro* de polifenóis e de matrizes alimentares como o suco de laranja.

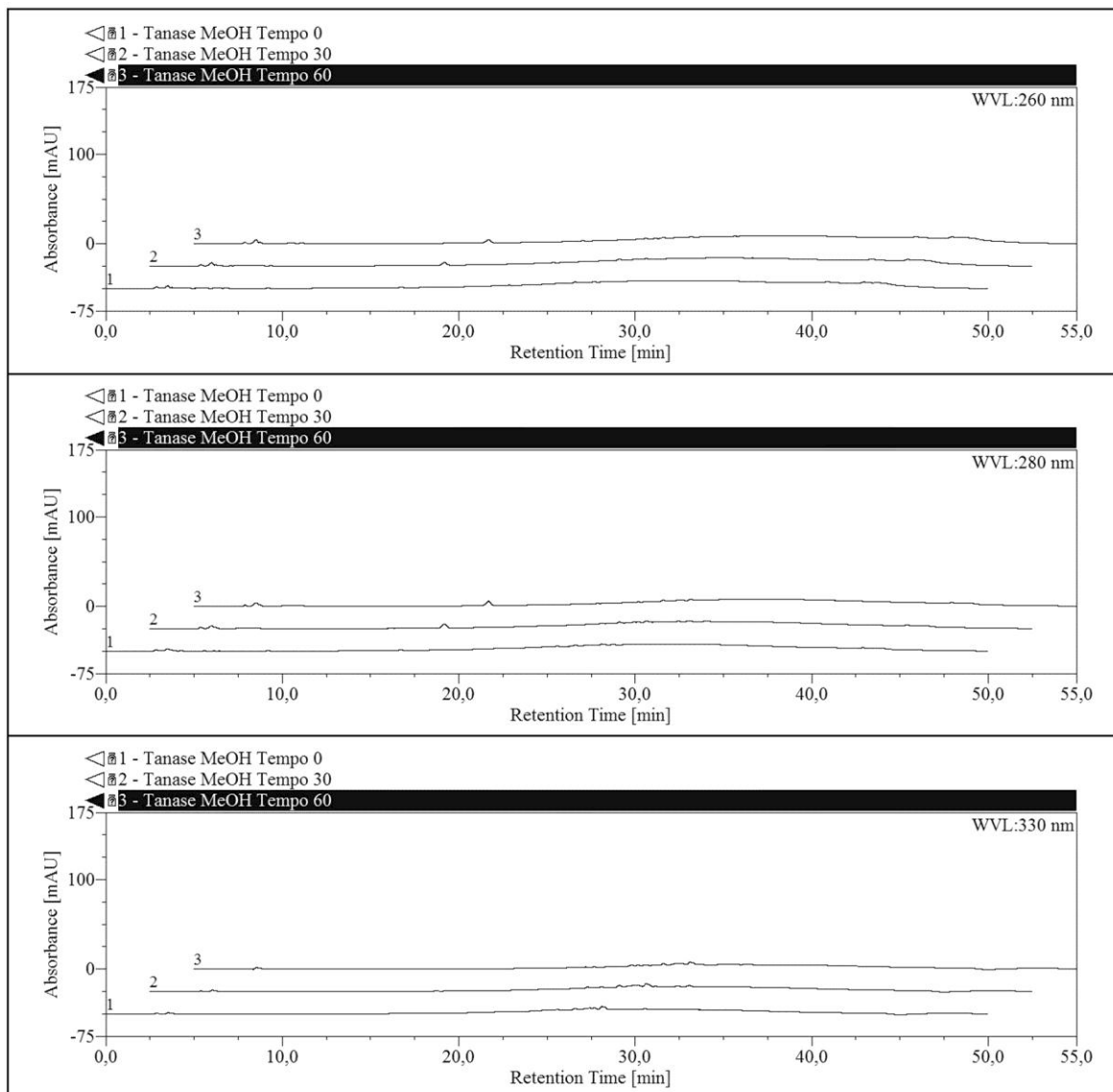
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando-se os resultados apresentados sugere-se:

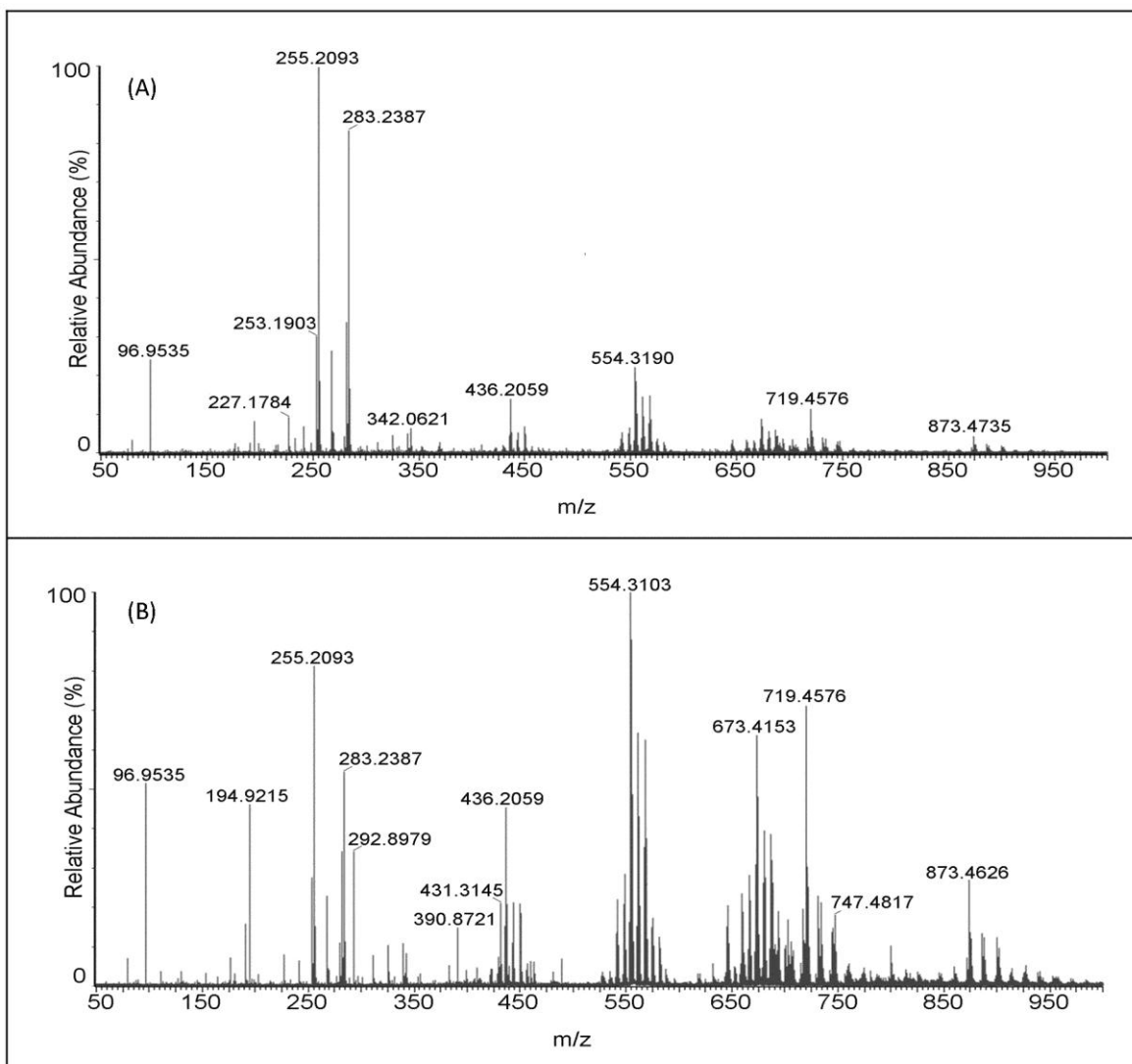
- Otimizar as condições da reação entre os substratos polifenólicos e o extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* e avaliar o rendimento do processo;
- Purificar a tanase de *P. variotii* e caracterizar sua especificidade quanto a diferentes polifenóis;
- Avaliar a biotransformação dos padrões polifenólicos e da matriz suco de laranja com o extrato semipurificado de tanase imobilizado;
- Identificar os compostos fenólicos do suco de laranja antes e após biotransformação com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* por espectrometria de massas;
- Ampliar os estudos de bioatividade do suco de laranja antes e após biotransformação com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* para modelos anti-inflamatórios e de quimioprevenção.

ANEXOS - CAPÍTULO II

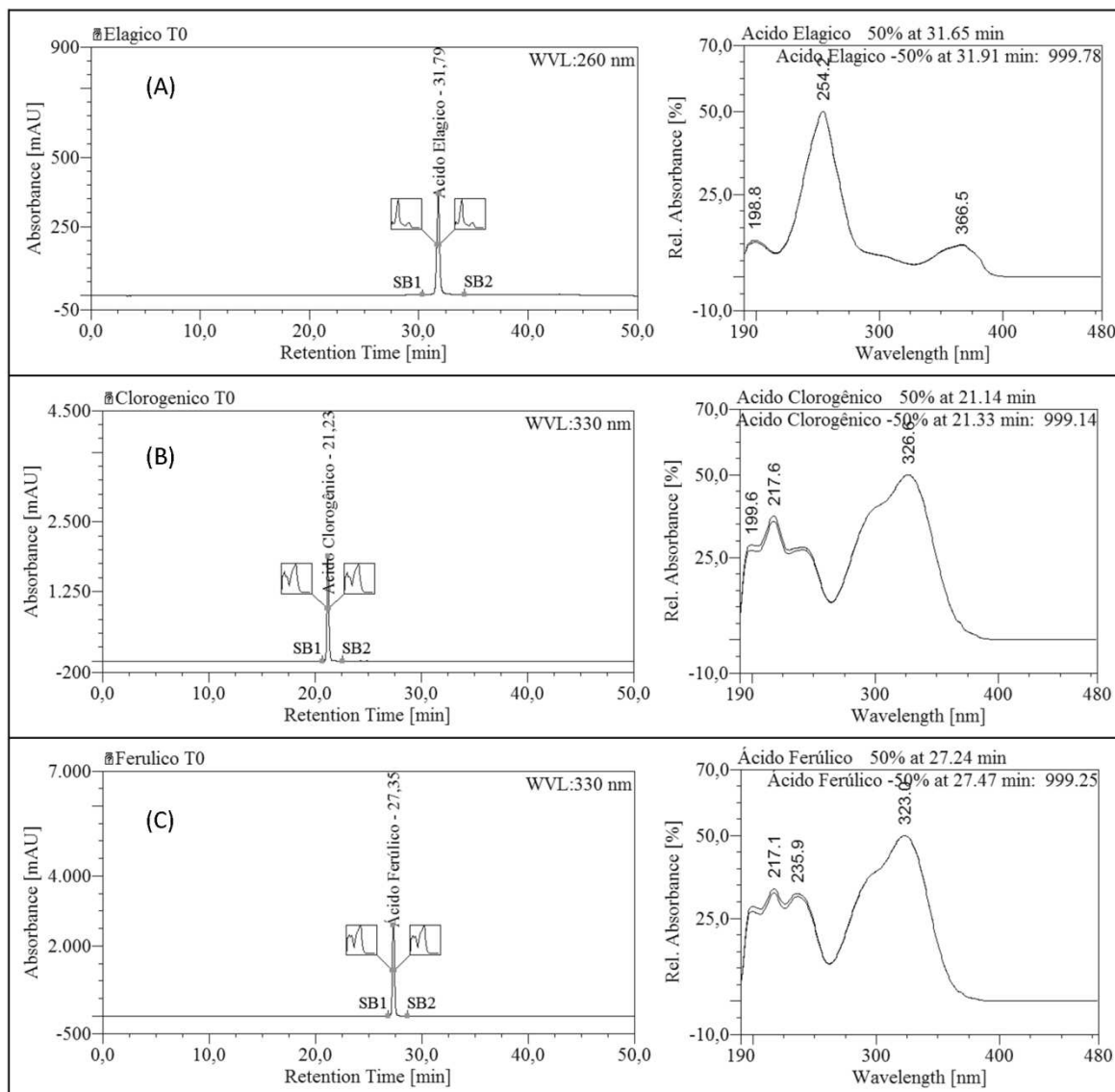
ANEXO A - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da tanase de *Paecilomyces variotii* nos tempos 0, 30 e 60 minutos de reação a 40°C em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4 processados a (A) 260 nm, (B) 280 nm e (C) 330 nm.



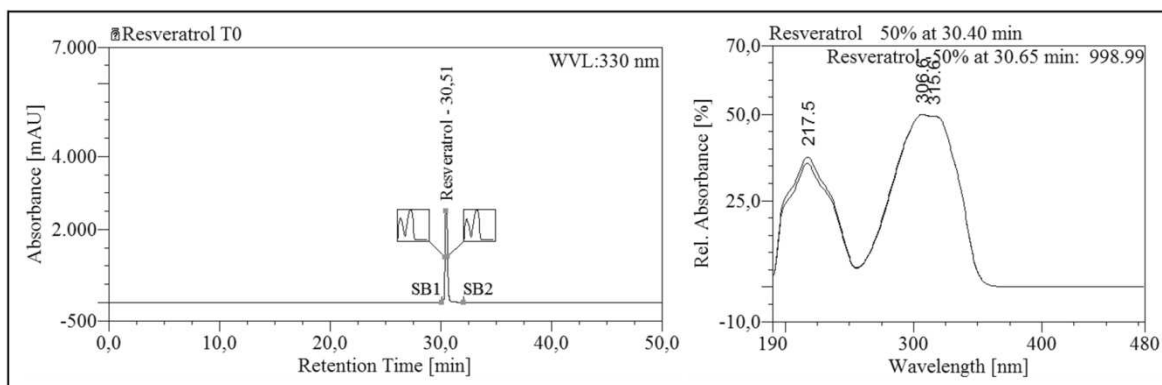
ANEXO B - Espectro de massas (ESI-MS modo negativo) da reação a 40°C de (A) tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4 no tempo 60 minutos e de (B) tanase de *Paecilomyces variotii* em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4 no tempo 60 minutos.



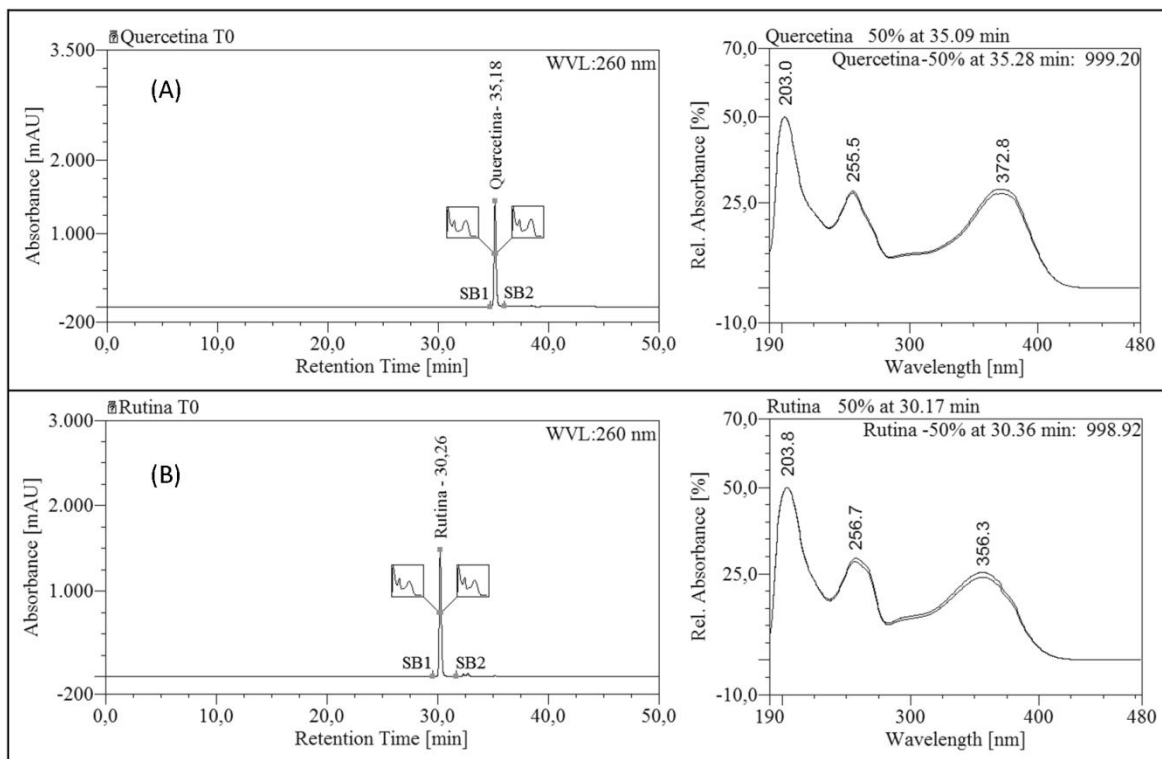
ANEXO C - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD com tempo de retenção e espectros de absorção dos ácidos fenólicos (A) ácido elágico, (B) ácido clorogênico e (C) ácido ferúlico.



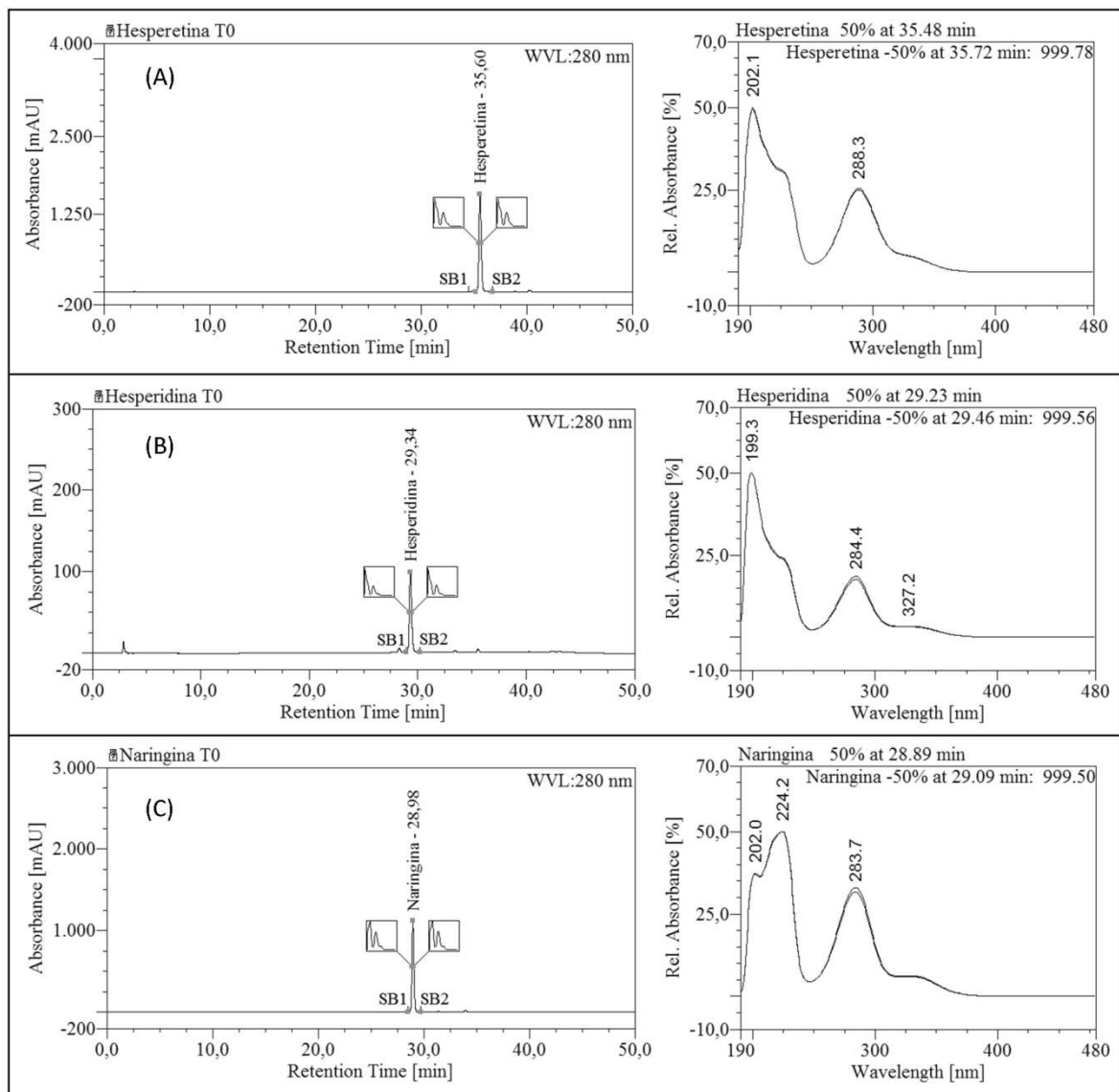
ANEXO D - Cromatograma obtido por CLAE-DAD com tempo de retenção e espectros de absorção do estilbeno resveratrol.



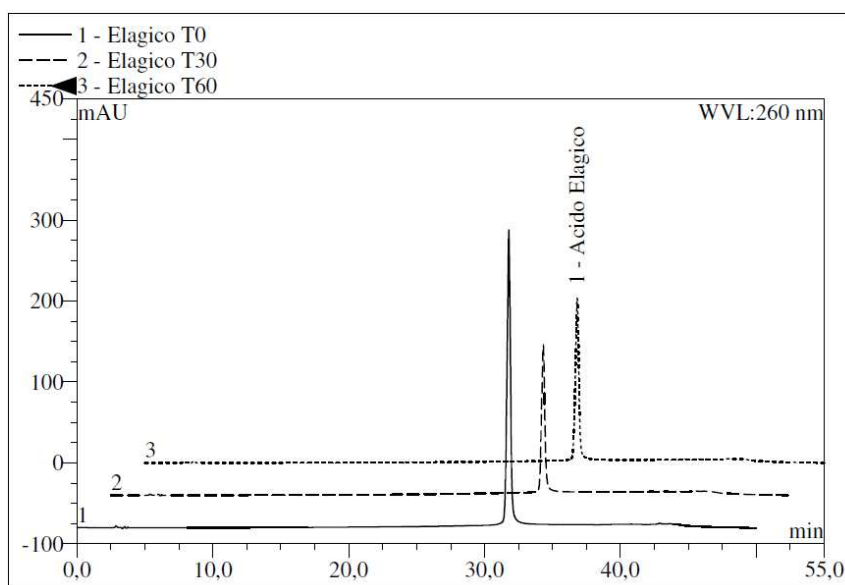
ANEXO E - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD com tempo de retenção e espectros de absorção dos flavonoides (A) quercetina, (B) rutina.



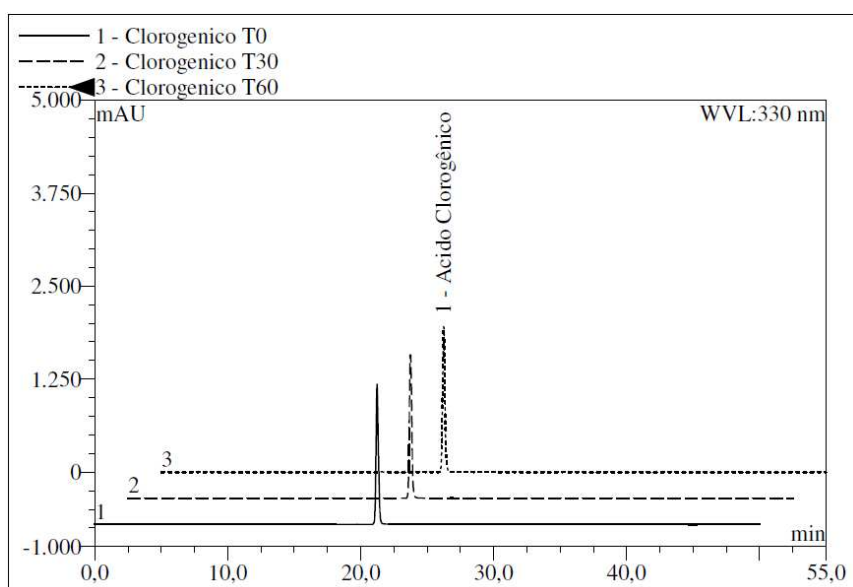
ANEXO F - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD com tempo de retenção e espectros de absorção dos flavonoides (A) hesperetina, (B) hesperidina e (C) naringina.



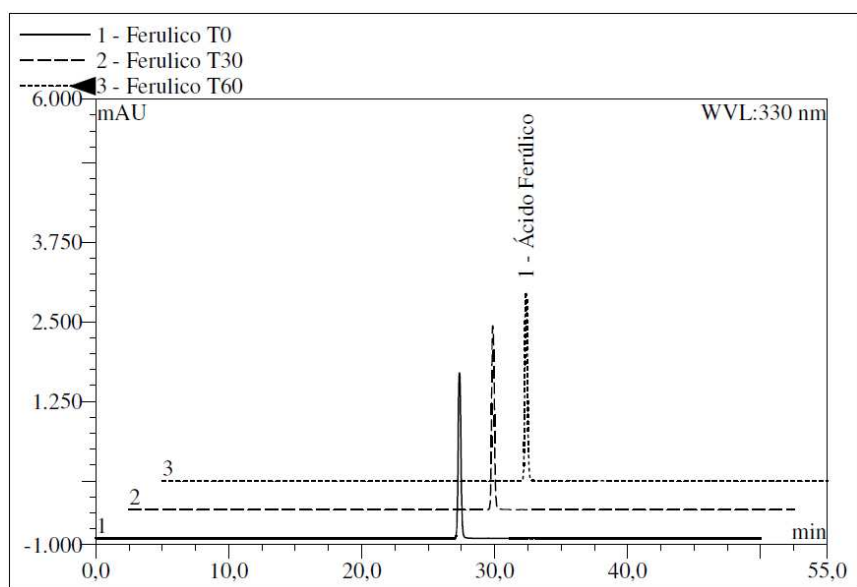
ANEXO G - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação do ácido elágico puro a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



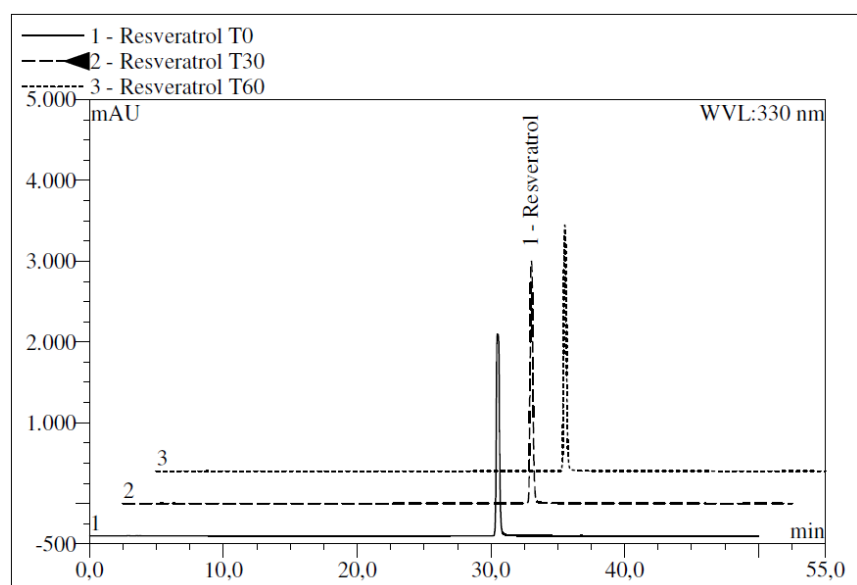
ANEXO H - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do ácido clorogênico puro a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



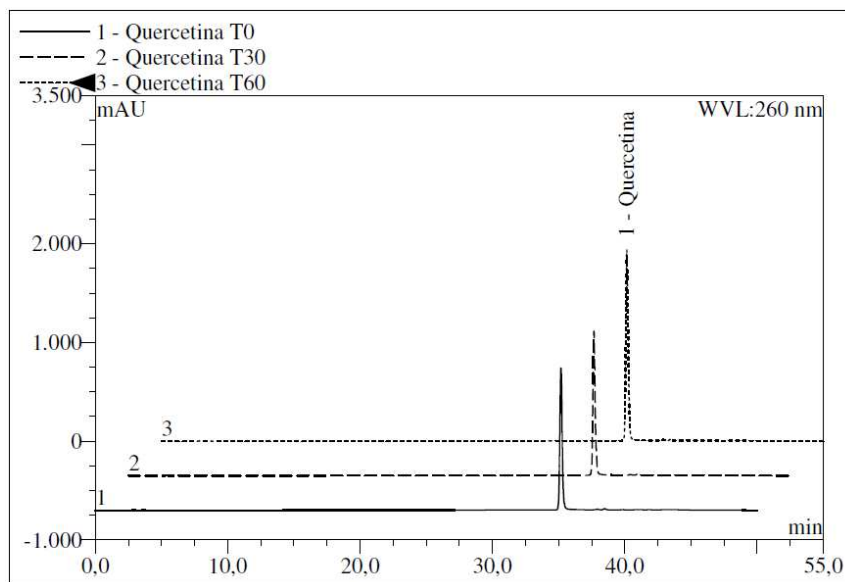
ANEXO I - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do ácido ferúlico puro a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



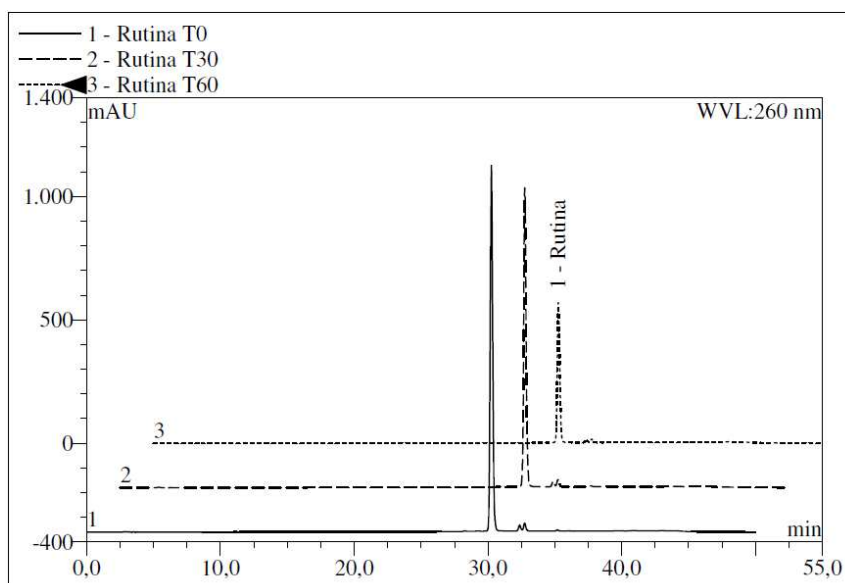
ANEXO J - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do resveratrol puro a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



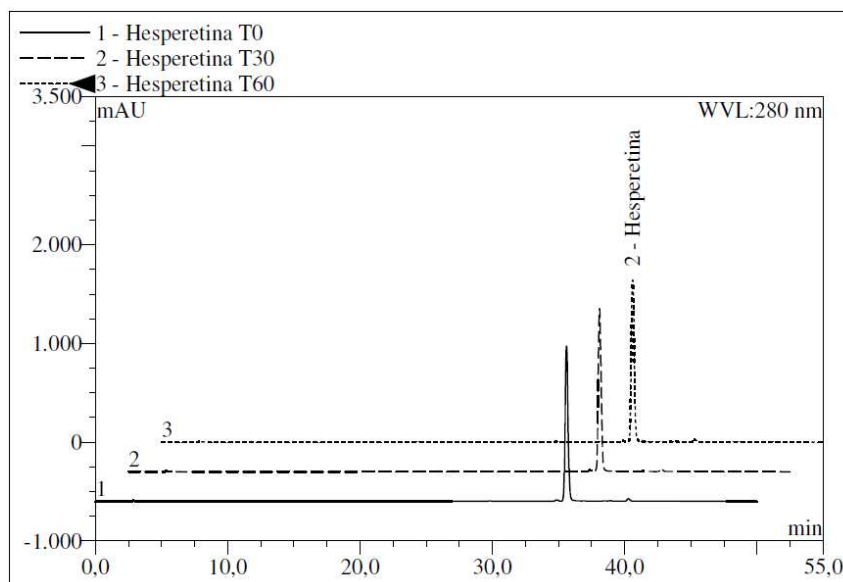
ANEXO K - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação da quercetina pura a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



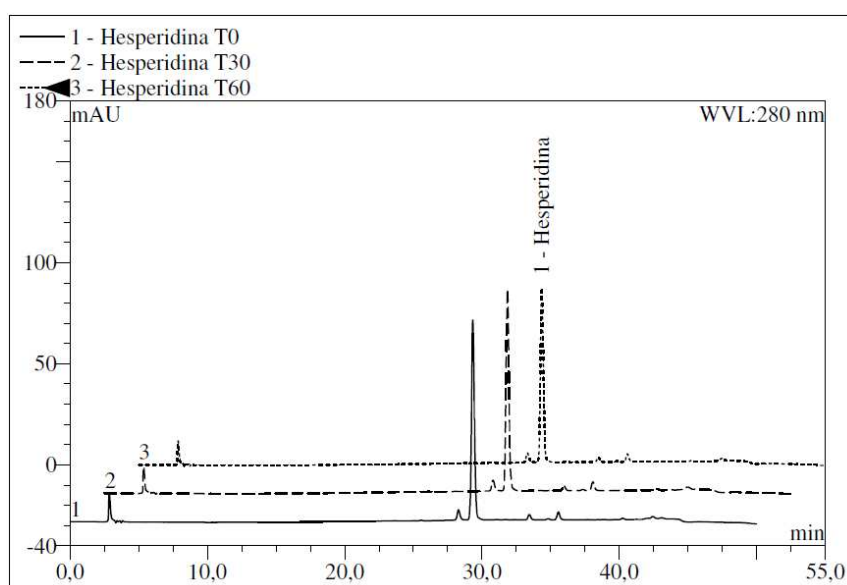
ANEXO L - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 260 nm da reação da rutina pura a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



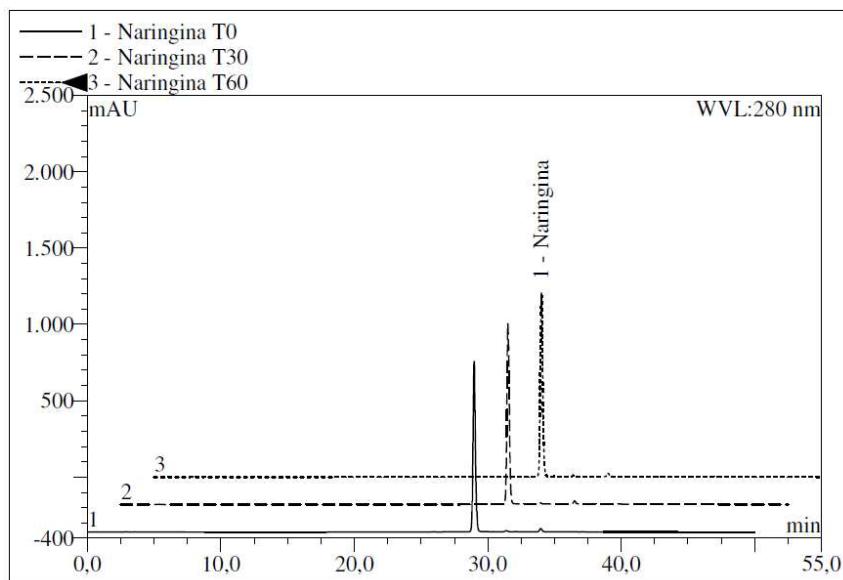
ANEXO M - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da hesperetina pura a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



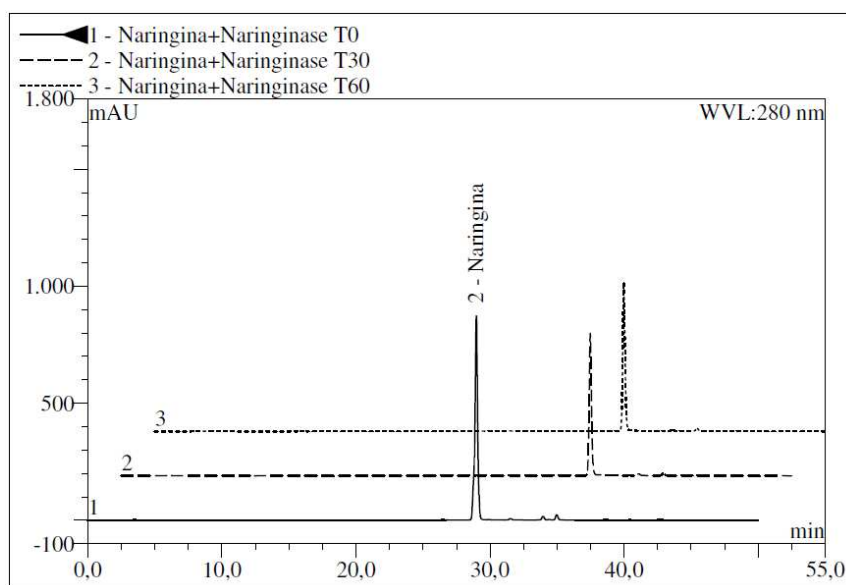
ANEXO N - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da hesperidina pura a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



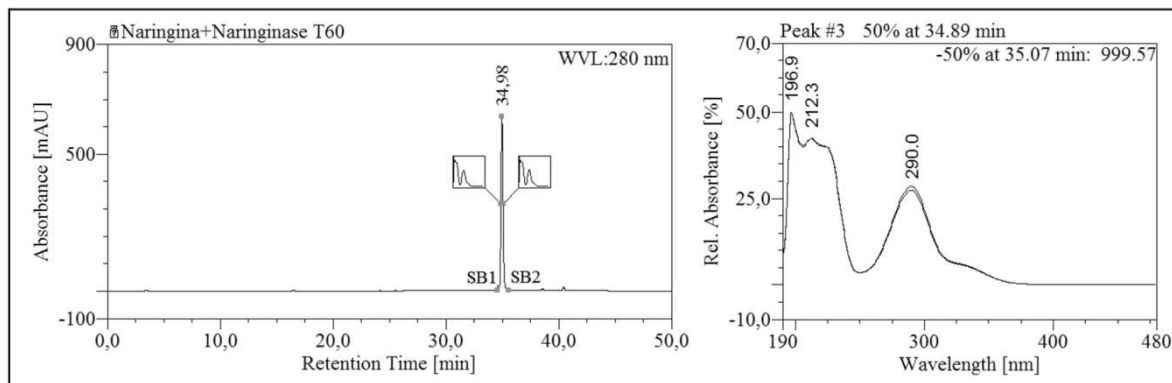
ANEXO O - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da naringina pura a 40°C e pH 7,4 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que não houve degradação espontânea do padrão em decorrência das condições de reação.



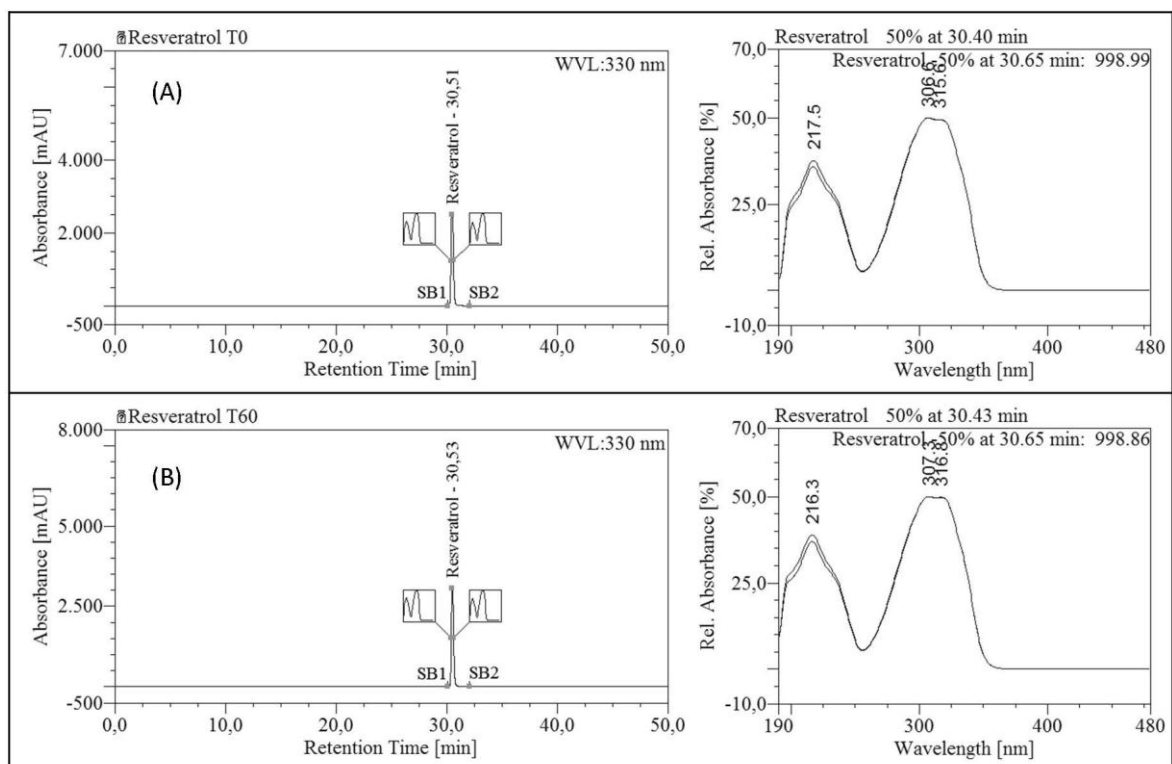
ANEXO P - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação da naringina com naringinase comercial a 40°C e pH 4,0 nos tempos 0, 30 e 60 minutos (cromatogramas 1, 2 e 3, respectivamente) indicando que houve hidrólise total da naringina antes dos 30 minutos de reação.



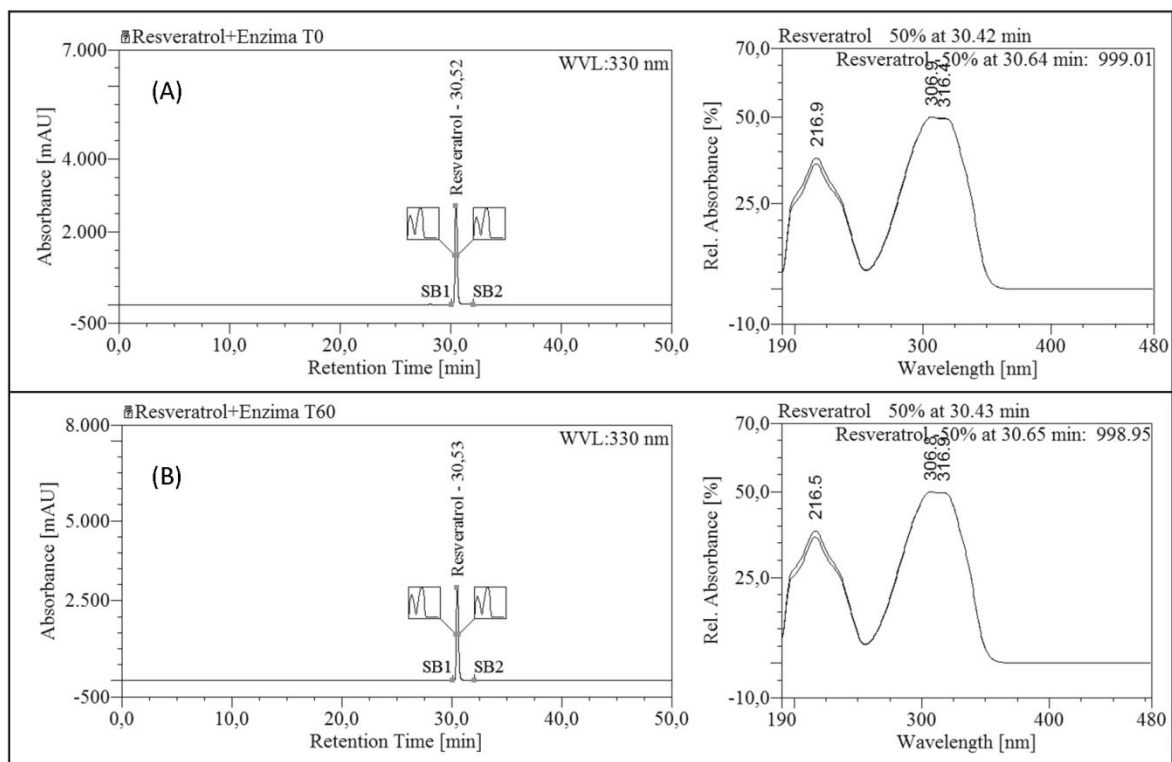
ANEXO Q - Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 280 nm da reação da naringina com naringinase comercial a 40°C e pH 4,0 no tempo 60 minutos com destaque para o espectro de absorção do produto da reação.



ANEXO R - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do resveratrol a 40°C e pH 7,4 com destaque para o espectro de absorção nos tempos (A) 0 minutos e (B) 60 minutos e não indicando isomerização com as condições de reação.

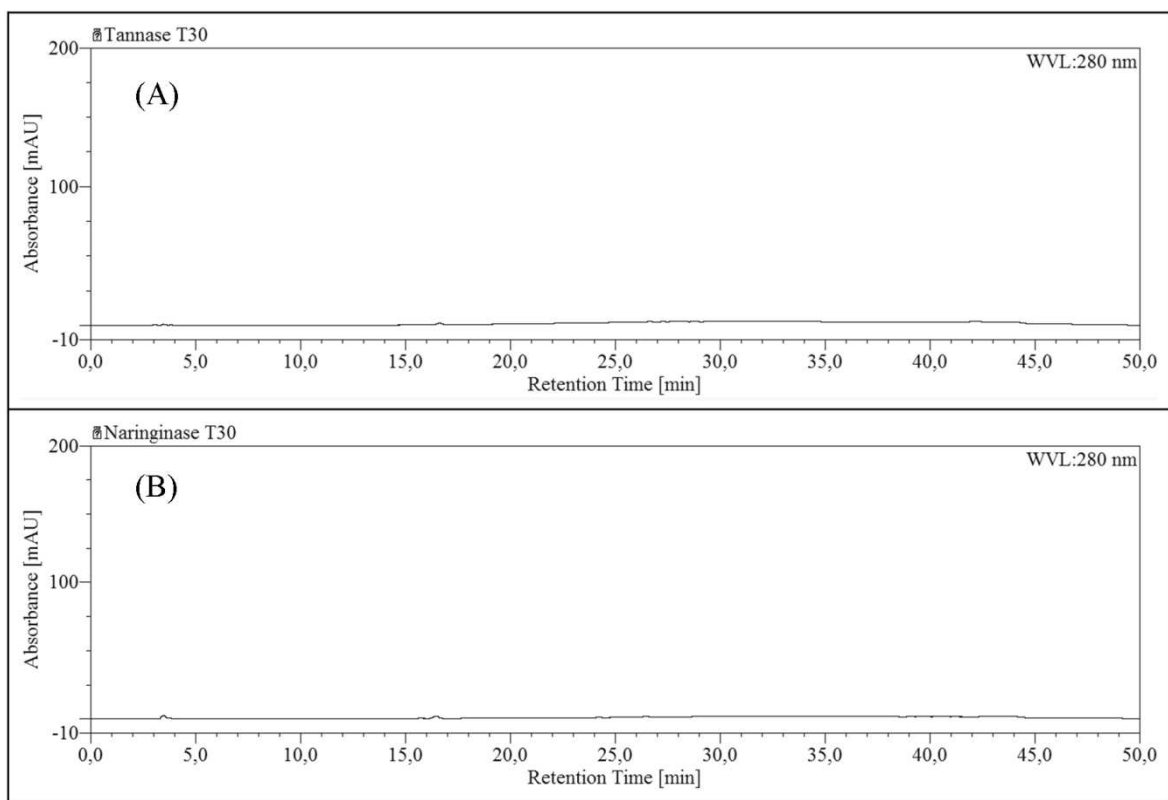


ANEXO S - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 330 nm da reação do resveratrol com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* a 40°C e pH 7,4 e destaque para o espectro de absorção do resveratrol nos tempos (A) 0 minutos e (B) 60 minutos e não indicando isomerização com as condições de reação.

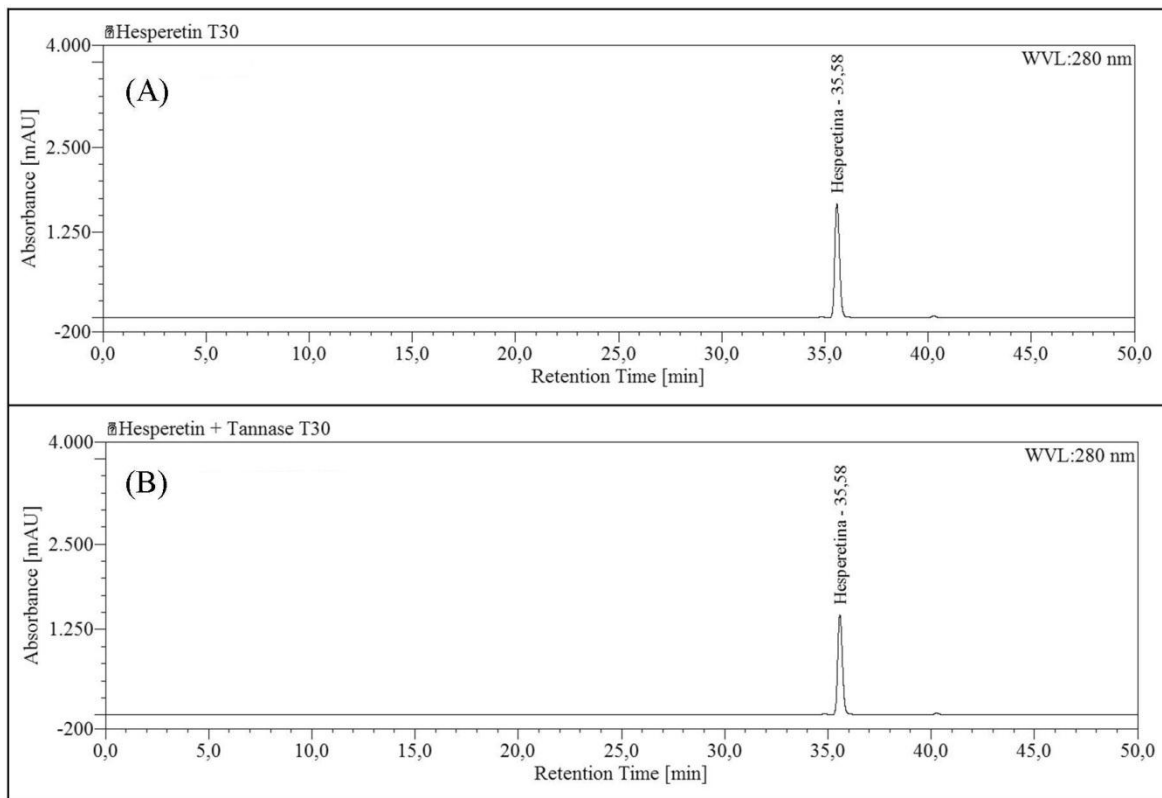


ANEXOS - CAPÍTULO III

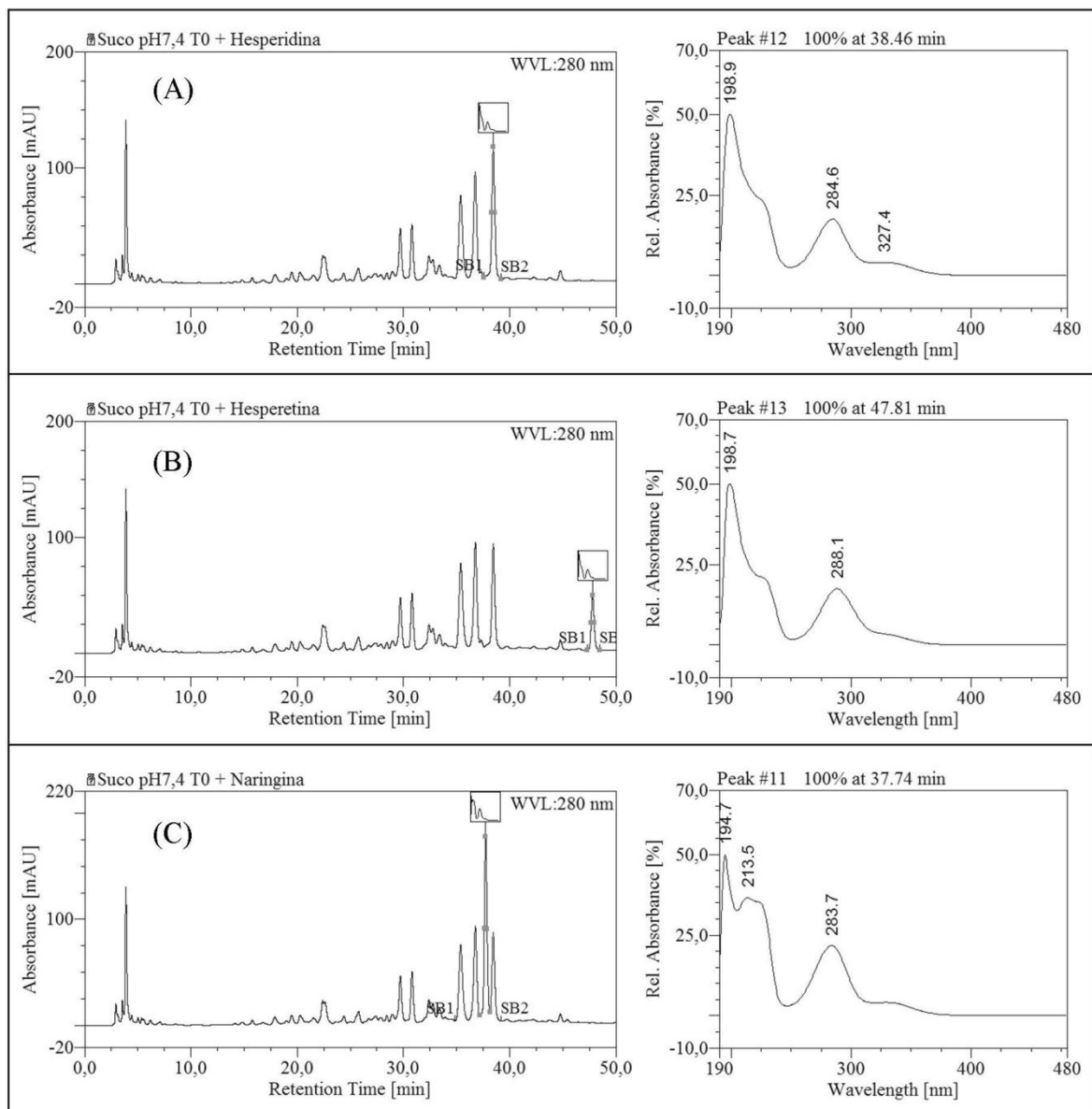
ANEXO A - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de 30 minutos a 40°C (A) do extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ e (B) naringinase comercial de *Penicillium decumbens* em tampão acetato 100 mmol.L⁻¹ pH 4,0.



ANEXO B - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm da reação de 30 minutos a pH 7,4 e 40°C da (A) hesperetina e (B) hesperetina com extrato semipurificado de tanase *Paecilomyces variotii*.



ANEXO C - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD a 280 nm do suco de laranja adicionado de (A) hesperidina, (B) hesperetina e (C) naringina, com destaque para os espectros de absorção dos produtos adicionados.



ANEXO D - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da (A) amostra de suco de laranja em pH 7,4 sem tratamento e (B) da amostra de suco de laranja em pH 7,4 em reação a 40°C por 30 minutos.

