

Lívia Beatriz Brenelli de Paiva

**Desenvolvimento de estratégias para produção biotecnológica de
ácido ferúlico e xilooligossacarídeos a partir do
bagaço de cana-de-açúcar**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Lívia Beatriz Brenelli de Paiva

**Desenvolvimento de estratégias para produção biotecnológica de
ácido ferúlico e xilooligossacarídeos a partir do
bagaço de cana-de-açúcar**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lívia Beatriz Brenelli de Paiva
e aprovada pela Comissão julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de Mestra em
Biotecnologia e Tecnologia de Produtos
Bioativos, na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Marcio Squina

Campinas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B75d Brenelli, Livia Beatriz, 1987-
Desenvolvimento de estratégias para produção biotecnológica de ácido ferúlico e xilooligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar / Livia Beatriz Brenelli de Paiva. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Fabio Marcio Squina.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bagaço de cana. 2. Bioconversão. 3. Hemicelulose. 4. Compostos fenólicos. 5. Xilooligossacarídeos. I. Squina, Fabio Marcio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: The development of strategies for biotechnological production of ferulic acid and xylooligosaccharides from sugar cane bagasse

Palavras-chave em Inglês:

Cane bagasse

Bioconversion

Hemicellulose

Phenolic compounds

Xylooligosaccharides

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Fabio Marcio Squina [Orientador]

Mary Ann Foglio

Roberto Ruller

Data da defesa: 19-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 19 de Fevereiro de 2013.

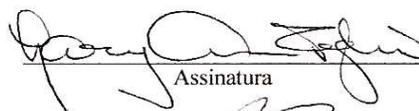
BANCA EXAMINADORA

Dr. Fabio Marcio Squina (Orientador)



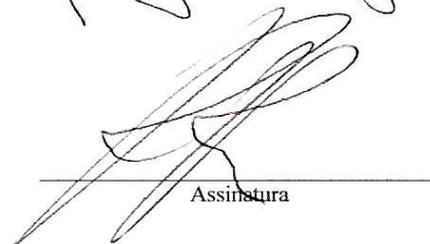
Assinatura

Dra. Mary Ann Foglio



Assinatura

Dr. Roberto Ruller



Assinatura

Dra. Daniela Alves Ribeiro

Assinatura

Dra. Rosana Goldbeck

Assinatura

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Antonio e Luciane, minha gratidão pelo amor e incentivo,
e a toda a minha família.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Fabio Marcio Squina pela oportunidade concedida, pelo aprendizado, paciência e compreensão.

Ao Prof. Wanderley Dantas dos Santos por ter colaborado com o início deste projeto, que me foi apresentado quando ainda era estagiária, ao Cleiton M. Pinto e ao Fernando Segato por terem me concedido o fruto dos seus trabalhos para que eu pudesse dar continuidade.

Agradeço com gratidão àquela que em meus primeiros meses de laboratório teve a paciência de me ensinar com tanta disposição e com o passar do tempo se tornou uma grande parceira,
Dr^a Daniela A. Ribeiro.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) por aceitar meu projeto de pesquisa e pelo suporte técnico.

À Universidade Estadual de Campinas, através do Instituto de Biologia e ao programa de pós-graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do CTBE pela amizade, pelo companheirismo, momentos únicos e divertidos. Aos amigos Zaíra, Júnio, Douglas, Thabata, Priscila, Rebequinha, Rodrigo, Hans, Beto, Evandro, Aline e aos grandes mestres Segato, Bragatto, André, Roberto, Rolf e as novas, mas não menos importantes, Carla e Rosana. Obrigada a todos pelos incentivos, pelas brincadeiras, conversas, sugestões, dicas. Sou grata a vocês pela alegria contagiante e entusiasmo naqueles dias em que nada parece dar certo e pelo companheirismo e amizade nas celebrações.

À Ana Paula Citadini, pela amizade, paciência e ajuda incondicional durante os experimentos. Pela sua dedicação e vontade, por dividir meus problemas, pelas idéias, otimismo e soluções, pelo olhar altamente refinado e crítico. Por todos os conselhos.

À Fernanda “loira” e a Fernanda “morena” e Thiago (Titi) pela amizade, pelo companheirismo, pelas dúvidas, calma e gentileza.

Ao meu amigo João (John e os cupins), o maior de todos, pela forte amizade, mensagens no meu ego, pelos momentos de diversão, pelo apoio, pela disposição em me ajudar e me socorrer em todos os momentos que precisei.

À equipe do o Laboratório de Química dos Alimentos, situado no Departamento de Ciência dos Alimentos (Faculdade de Engenharia dos Alimentos) na Universidade Estadual de Campinas, em especial, Prof^{ra} Adriana Z. Mercadante pelo suporte.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da dissertação.

Aos professores da UNICAMP, com quem tive a oportunidade de enriquecer o meu conhecimento.

Aos meus pais Antonio e Luciane, por todo apoio, carinho, incentivo e amor incondicional. Sem toda a ajuda, eu não teria meios de crescer. Por me ensinar os verdadeiros valores de uma vida.

Aos meus irmãos que eu amo imensamente, Camila, Mariá, Thomás e Giovanna pela convivência.

Ao meu companheiro e confidente Eduardo de todos os momentos, tantos bons quanto desanimadores, pelo grande amor, pelo apoio, por estar ao meu lado.

A gratidão pela conclusão de uma etapa, pelas pessoas no caminho, pelo sol depois da tempestade, pelas dádivas me concedidas e a esperança no fim do dia é Dele. Obrigada Deus.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial abundante no Brasil que pode ser utilizado como matéria-prima em uma biorrefinaria para produção de compostos com interesse industrial. A dificuldade para conversão do bagaço de cana e outros materiais lignocelulósicos em biocombustíveis ou insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Neste sentido, um dos principais desafios que envolvem esta bioconversão é a desconstrução da parede celular de forma eficiente e economicamente viável. O aproveitamento do bagaço de cana para produção de ácido ferúlico e de xilooligossacarídeos pode representar uma estratégia interessante de bioconversão de um resíduo agroindustrial em moléculas de alto valor agregado. O estudo descrito nesta dissertação aborda o desenvolvimento de uma rota biotecnológica utilizando o bagaço de cana para produção de ácido ferúlico, empregando a enzima feruloil esterase do fungo *Aspergillus clavatus*, e xilooligossacarídeos, fazendo uso de endo-xilanase e arabinofuranosidase, dos fungos *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger*, respectivamente. Neste trabalho, estas enzimas recombinantes foram super expressas em sistema heterólogo, sendo a feruloil esterase expressa em *Escherichia coli*, enquanto a xilanase e a arabinofuranosidase expressas em *Aspergillus nidulans* como hospedeiro. O emprego da feruloil esterase resultou na liberação de ácido ferúlico e outros compostos fenólicos com capacidade antioxidante, utilizando o bagaço de cana e o arabinoxilano de trigo como substrato. O pré-tratamento químico do bagaço de cana mostrou ser adequado para aumentar a eficiência deste processo de conversão enzimática. A atividade sinérgica da endo-xilanase e arabinofuranosidase propiciou uma melhor eficiência na produção de xilooligossacarídeos a partir do bagaço de cana. Os estudos aqui descritos, quanto à utilização de bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção destes compostos com apelo biotecnológico, são inéditos na literatura. Além disso, os resultados deste trabalho, também contribuíram para a melhor compreensão do mecanismo de ação destas enzimas sobre este tipo de biomassa, bem como na elucidação de quais enzimas são necessárias para conversão do bagaço de cana em bioprodutos.

Palavras chave: bagaço de cana-de-açúcar, bioconversão, hemicelulases, compostos fenólicos, xilooligossacarídeos.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is an abundant agroindustrial residue in Brazil that can be used as feedstock biorefineries for the production of bioactive compounds of industrial interest. The difficulty on the conversion of sugarcane bagasse and other lignocellulosic materials into biofuels or chemicals is attributed to their chemical and morphological characteristics. Thus, one of the main challenges involved in this bioconversion route is the efficient and economically viable deconstruction of plant cell wall. The use of bagasse for the production of ferulic acid and xylooligosaccharides may represent an interesting alternative route for bioconversion of an agroindustrial residue into value-added molecules. This dissertation describes the development of a biotechnological approaches using sugarcane bagasse for the production of ferulic acid by employing the feruloyl esterase enzyme from the fungus *Aspergillus clavatus*. Likewise, the production of xylooligosaccharides was also described using arabinofuranosidase and endo-xylanase from the fungi *Penicillium funiculosum* and *Aspergillus niger*, respectively. These recombinant enzymes were over expressed in heterologous systems, meanwhile the feruloyl esterase was expressed in *Escherichia coli*, the arabinofuranosidase and xylanase were expressed in *Aspergillus nidulans* as host. Ferulic acid and other phenolic compounds with antioxidant capacity were released by the action feruloyl esterase using sugarcane bagasse and wheat arabinoxylan as substrate. Chemical pretreatment of the sugarcane bagasse proved to be suitable to increase the efficiency of the enzymatic conversion process. The synergistic activity of the endo-xylanase and arabinofuranosidase enzymes led to greater efficiency on the production of xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. The studies described here, regarding the use of sugarcane bagasse as substrate for production of these compounds with biotechnological appealing are unprecedented in literature. Furthermore, the results of this work also contributed to better understanding the mechanism of enzyme action on this type of biomass, as well as to determine which enzymes are important for conversion of sugarcane bagasse into bioproducts.

Keywords: sugarcane bagasse, bioconversion, hemicellulases, phenolic compounds, xylooligosaccharides.

LISTA DE ABREVIACOES

AC -  cido cafeico

AcFAE - feruloil esterase de *Aspergillus clavatus*

AD - Doença de Alzheimer

AF -  cido ferúlico

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

AOM - azoximetano

ApCa -  cido *p*-cumárico

CAT - catalase

CAZy - Banco de Dados de Enzimas Ativas em Carboidratos

CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

CZE - Eletroforese capilar de zona

DM - diabetes mellitus

DMBA - 7,12-dimetilbenz (a)antraceno

DMSO - dimetilsulfóxido

DTT - DL - ditioneitol

EDTA -  cido etilenodiamino tetra-acético

EOF - fluxo eletroosmótico

ET - etil ferulato

FA -  cido ferúlico

FA15 -  cido 2-metil-1-butil ferúlico

FAE - feruloil esterase

GPx - Glutathione Peroxidase

HPAE-PAD - cromatografia de troca aniônica-pulsada de alta performance com detec o amperométrica

IFA -  cido isofer lico

IPTG - isopropil β -D-tiogalactopiranosida

kV - kilovolts

MC - metil cafeato

MCT - transportadores de ácidos monocarboxílicos
MF - metil ferulato
MpCA - metil *p*-cumarato
NA - α -naftil acetato
NB - naftil butirato
ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigênio
PA - Doença de Parkinson
PAL - Fenilalanina amônia liase
PFU - Unidade formadora de placas
pH - potencial hidrogeniônico
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila
ROS - Espécies reativas ao oxigênio
SAB - tampão ácido acético/acetato de sódio
SOD - superóxido dismutase
TAL - tirosina amônia liase
XOS - xilooligossacarídeos

SUMÁRIO

Introdução.....	13
Objetivos.....	17
Objetivos gerais	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 1 – O bagaço de cana-de-açúcar como fonte de energia renovável e insumos.....	19
1.1. O Contexto brasileiro na produção de biocombustíveis	19
1.2. O potencial do bagaço de cana-de-açúcar.....	19
1.3. A composição do bagaço da cana-de-açúcar	20
1.4. A obtenção do etanol de segunda geração: perspectivas e desafios	25
1.4.1. Endoxilanases	28
1.4.2. Arabinofuranosidasas	29
1.4.3. Feruloil esterases	30
1.5. Os radicais livres e os antioxidantes	35
1.6. Os antioxidantes naturais	36
1.7. Ácido ferúlico: potenciais e aplicações biotecnológicas	37
1.8. Referências.....	41
CAPÍTULO 2 - Estudos para obtenção de ácido ferúlico a partir do bagaço de cana-de-açúcar utilizando a enzima feruloil esterase de <i>Aspergillus clavatus</i>	47
2.1. Introdução	47
2.2. Material e métodos	48
2.2.1. Expressão e purificação de uma feruloil esterase de <i>Aspergillus clavatus</i>	48
2.2.2. Ensaio enzimático empregando substratos sintéticos para caracterização da FAE de <i>A.clavatus</i>	52
2.2.3. Ensaio enzimático para avaliação da capacidade da FAE de <i>A.clavatus</i> na liberação de compostos fenólicos a partir da biomassa.....	54
2.2.4. Ensaio enzimático para avaliação da capacidade da FAE de <i>A.clavatus</i> na liberação de compostos fenólicos de bagaço de cana pré-tratado quimicamente	55
2.2.5. Ensaio para a quantificação dos compostos fenólicos liberados da biomassa lignocelulósica via tratamento enzimático e determinação de suas capacidades antioxidantes.....	56

2.2.6. Construção de uma árvore filogenética utilizando sequências de aminoácidos de diferentes tipos FAEs	57
2.3. Resultados e Discussão.....	58
2.3.1. Ensaio enzimático empregando substratos sintéticos e classificação da FAE em estudo.....	58
2.3.2. Avaliação da capacidade da FAE de <i>A.clavatus</i> na liberação de compostos fenólicos a partir de substratos naturais	61
2.3.3. Avaliação da capacidade da FAE de <i>A.clavatus</i> na liberação de compostos fenólicos de bagaço de cana pré-tratado quimicamente.....	63
2.3.4. Quantificação dos compostos fenólicos liberados da biomassa lignocelulósica via tratamento enzimático e determinação de suas capacidades antioxidantes.....	65
2.4. Conclusões.....	68
2.5. Referências	68
CAPÍTULO 3 - Estudos sobre a atuação sinérgica entre endo-xilanase GH11 e uma arabinofuranosidase GH54 para produção de xilooligossacarídeos a partir de biomassa.....	71
3.1. Introdução.....	71
3.2. Material e métodos	71
3.2.1. Expressão e purificação da XynC e AbfB	71
3.2.2. Ensaio de sinergia entre XynC e AbfB	73
3.3. Resultados e Discussão.....	74
3.3.1. Avaliação da sinergia entre XynC e AbfB sobre a biomassa.....	74
3.4. Conclusões.....	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
ANEXO 1	83
ANEXO 2	121
ANEXO 3	125
ANEXO 4	129

Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto de grande destaque nas atividades agrícolas brasileiras em razão da quantidade que é gerado anualmente, o que evidencia que este material deve ser aproveitado para atividades mais nobres que seu abastecimento nas caldeiras de usinas para geração de energia elétrica. Desta forma, a bioconversão do bagaço de cana em etanol de segunda geração e outras moléculas de valor associado, como químicos finos, é uma ferramenta promissora do ponto de vista econômico e especialmente ambiental, onde o processo empregará como matéria-prima um subproduto em abundância no país com custo relativamente baixo e produzirá moléculas de valor agregado com amplas aplicações. Além do fato de que o bagaço poderá ser integralmente aproveitado com a mínima geração de resíduos (Seabra, 2008; Siqueira, 2011; Moura, 2012).

O bagaço de cana apresenta em sua composição majoritária celulose, hemicelulose e lignina, e a complexidade destes componentes e a forma como estão ligados é um dos fatores que dificulta a bioconversão (Buckeridge *et al.*, 2008; Ogeda e Petri, 2010; Siqueira, 2011).

Neste sentido, muito tem se investido em tecnologias para tornar esse processo viável, com o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos que promovam a desconstrução da parede celular da cana-de-açúcar e um pré-tratamento que contribua para eficiência de hidrólise enzimática. O emprego de enzimas para essa conversão garante ao processo inúmeras vantagens em relação aos processos que envolvem solventes orgânicos e processos de síntese química como as condições reacionais brandas (menor consumo energético, pressão atmosférica e pH em torno da neutralidade) e possibilidade de reciclagem das enzimas, o que torna possível reduzir custos. A especificidade na obtenção dos produtos e menor geração de resíduos são também vantagens que fazem que com esse processo seja considerado correto do ponto de vista ecológico (Rozzell, 1999; Siqueira, 2011; Scheufele *et al.*, 2012).

Pesquisas nos últimos anos apontam uma nova classe de enzimas, denominadas feruloil esterases, que apresentam potencial para serem empregadas no processo de conversão de biomassas lignocelulósicas visando à produção do bioetanol e também para obtenção de ácido ferúlico, um ácido fenólico com propriedade antioxidante patente e relacionado ao uso terapêutico na prevenção e tratamento de algumas doenças e ainda como molécula precursora na

produção da vanilina (Srinivasan *et al.*, 2007; Fazary e Ju, 2007; 2008; Gioia *et al.*, 2011). Quando obtido a partir de fontes renováveis, o ácido ferúlico é considerado um produto natural, o que justifica o interesse em pesquisas para o desenvolvimento desta rota biotecnológica (Faulds *et al.*, 1997).

Outras moléculas com interesse comercial também podem ser obtidas a partir de fontes renováveis, empregando as enzimas xilanases e arabinofuranosidades: os xilooligossacarídeos (XOS). Considerados ingredientes de alimentos funcionais, os XOS promovem uma série de benefícios ao sistema digestivo e imunológico e apresentam vantagens em relação a outros oligossacarídeos em termos de estabilidade e efeitos à saúde (Meneses e Durrant, 2008; Chapla *et al.*, 2011).

Como estudos anteriores apontam, o bagaço da cana-de-açúcar é uma fonte adequada para produzir esses compostos via rota enzimática (Ou *et al.*, 2007). Neste sentido, esta dissertação avaliou estratégias para produção de ácido ferúlico e outros compostos com capacidade antioxidante e XOS utilizando o bagaço de cana e outros substratos naturais. Uma feruloil esterase não descrita na literatura e uma xilanase GH11 combinada com uma arabinofuranosidase GH54 foram empregadas neste estudo.

O capítulo 1 é uma revisão da literatura sobre produção de biocombustíveis no Brasil, destacando o potencial do bagaço de cana para produção de bioetanol e outras substâncias, bem como a composição química deste bagaço e as perspectivas e desafios desta bioconversão. Mais especificamente, o capítulo traz algumas informações relevantes sobre as três enzimas que foram empregadas neste trabalho, a feruloil esterase (FAE), endo-xilanase (XynC) e arabinofuranosidase (AbfB) e as aplicações biotecnológicas do ácido ferúlico e xilooligossacarídeos que podem ser obtidos a partir do bagaço de cana. O anexo 1 é um artigo de revisão submetido para publicação onde reúnem estudos sobre o ácido ferúlico e derivados e potencial aplicação da área farmacêutica.

No capítulo 2 estão descritas detalhadamente as estratégias e metodologias adotadas para desenvolver uma possível rota biotecnológica empregando FAE de *Aspergillus clavatus* expressa em *E.coli* BL21 para obtenção de ácido ferúlico a partir do bagaço de cana e avaliação da capacidade antioxidante dos produtos liberados da hidrólise enzimática, bem como todos os resultados e discussões relativas ao tema. O capítulo 3 descreve as estratégias e metodologias

adotadas para compreender o modo de atuação das enzimas XynC e AbfB, ambas expressas no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* na degradação da biomassa lignocelulósica visando a produção de xilooligossacarídeos.

Por fim, o último capítulo trata-se das considerações finais da dissertação e perspectivas. Os anexos 2 e 3 são os resumos referentes aos artigos científicos publicados durante o período do mestrado e o anexo 4 é a cópia do documento do depósito de pedido de patente de inovação intitulado “Processo de produção de compostos fenólicos e sistema enzimático”.

Objetivos

Objetivos gerais

Estudar estratégias para o desenvolvimento de uma rota biotecnológica para produzir a partir do bagaço de cana:

- ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico empregando uma feruloil esterase de *Aspergillus clavatus*;
- xilooligossacarídeos empregando uma endo-xilanase GH11 de *Penicillium funiculosum* e uma arabinofuranosidase GH54 de *Aspergillus niger*.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade da feruloil esterase de *Aspergillus clavatus* em diferentes substratos sintéticos e construir uma árvore filogenética utilizando as sequências de aminoácidos de feruloil esterases estudadas anteriormente e a de *Aspergillus clavatus*;
- Quantificar os compostos fenólicos liberados na hidrólise enzimática do bagaço de cana empregando a feruloil esterase de *Aspergillus clavatus* e avaliar as capacidades antioxidantes;
- Realizar um pré-tratamento químico no bagaço de cana para avaliar o aumento da liberação de compostos fenólicos na hidrólise enzimática;
- Analisar o perfil de xilooligossacarídeos liberados a partir do bagaço de cana tratado com a endo-xilanase GH11 de *Penicillium funiculosum* e a arabinofuranosidase GH54 de *Aspergillus niger*;
- Avaliar o sinergismo entre a endo-xilanase GH11 e a arabinofuranosidase GH54 sobre a hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana e compreender o modo de atuação dessas enzimas.

CAPÍTULO 1 – O bagaço de cana-de-açúcar como fonte de energia renovável e insumos

1.1. O Contexto brasileiro na produção de biocombustíveis

O sistema energético internacional é altamente dependente de combustíveis fósseis como o carvão, petróleo e gás, uma vez que 80% do consumo mundial atual de energia se originam dessas fontes. Este consumo apresenta um crescimento anual de cerca de 2% (média dos últimos 20 anos) mas somente no período de 2003 a 2008, por exemplo, cresceu 3,1% ao ano (Goldemberg, 2008). A partir destes dados fica evidente que o cenário mundial precisa de mudanças, não só pelo fato de que as reservas de combustíveis fósseis estão se esgotando, mas também pelos efeitos negativos ao meio ambiente em virtude do seu uso. Muitos países já optaram pelo uso de combustíveis alternativos e o etanol de primeira geração é um exemplo de combustível produzido a partir da fermentação de açúcares extraídos de fontes como cana-de-açúcar, milho e beterraba (Moura, 2012).

Nos anos 70, o governo federal estimulou a produção de etanol no Brasil, em função da instabilidade nos preços de combustíveis fósseis durante a crise do petróleo. O grande investimento em pesquisas sobre a cana-de-açúcar resultou em um grande número de variedades de cana, levando a um aumento considerável no conteúdo de açúcar na planta e, por conseguinte, da produção de etanol (Furtado e Scandiffio, 2006).

O Brasil se tornou também um país que domina todos os estágios da tecnologia de produção da cana-de-açúcar, apresentando uma cadeia bem organizada, onde os principais produtos são: açúcar, acetonas, etanol e subprodutos como melaço, palha, bagaço, torta de filtro e vinhoto (Farina e Zylbersztajn, 1998; Vidal *et al.*, 2006). O país é responsável por cerca de 30% do etanol produzido no mundo, porém, possui grande interesse em aumentar sua produção a fim de suprir a demanda mundial (Leite *et al.*, 2009).

Dessa forma, a obtenção do bioetanol a partir de material lignocelulósico é uma estratégia muito promissora para garantir este aumento na produção, e muito tem se investido no desenvolvimento de novas tecnologias para o aproveitamento integral da cana-de-açúcar.

1.2. O potencial do bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil dispõe de inúmeras atividades agroindustriais e, conseqüentemente, resíduos são gerados de processamentos, apresentados na forma de bagaço e fitobiomassa residual que podem conter muitas substâncias de alto valor e se empregada uma tecnologia adequada, podem ser

convertidos em produtos comerciais, matérias-primas para processos secundários e ainda agregar um enorme potencial energético (Laufenberg *et al.* 2003). Todavia, para que esse potencial venha a se tornar economicamente viável, é essencial o desenvolvimento de novas tecnologias para plataformas de biorefinarias para conversão de matérias primas à base de materiais lignocelulósicos (Pervaiz e Correa, 2009).

O bagaço de cana-de-açúcar é, sem dúvida, o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil. A cada tonelada de cana-de-açúcar processada, geram-se cerca de 250 a 300 quilos de bagaço e estima-se que a cada ano sejam produzidos de 5 a 12 milhões de toneladas deste material, sendo considerado o resíduo agroindustrial de maior destaque no país (Nascimento, 2010; Stefano, 2008).

Tradicionalmente o bagaço de cana é queimado nas próprias usinas para produção de eletricidade a fim de garantir a auto-suficiência energética (Rabello e Yoneya, 2008; Seabra, 2008). Porém, cerca de 15% da energia gerada é utilizada na própria usina, sendo o restante revendido para a rede de distribuição elétrica. Contudo, as usinas possuem um excesso de cerca de 10 % de bagaço que não é aproveitado, tornando evidente que o seu aproveitamento para o desenvolvimento de atividades mais nobres (do que sua queima para geração direta de energia) é uma necessidade nacional (Silva *et al.*, 2010).

A via bioquímica é uma das principais alternativas para produção de bioetanol a partir do bagaço da cana, onde o material lignocelulósico é digerido por enzimas para a liberação dos monossacarídeos constituintes, os quais em seguida são fermentados para gerar o bioetanol (dos Santos *et al.*, 2008; Siqueira, 2011). Entretanto, ainda existem obstáculos que impedem que este processo seja economicamente viável, tornando necessária a realização de pesquisas e investimentos em projetos que objetivam a melhora da digestibilidade química e enzimática da biomassa lignocelulósica para uma eficiente conversão (Silva *et al.*, 2009).

1.3. A composição do bagaço da cana-de-açúcar

A parede celular é uma estrutura extremamente complexa presente em todas as células vegetais (Fengel e Wegener, 1989; Kerbauy, 2008) sendo composta por polissacarídeos (representam cerca de 90% do peso seco da parede) que consistem em celulose (compõe de 20-40%), hemiceluloses (15-25%) e pectinas (cerca de 30%). A celulose (Figura 1) é o polímero majoritário da parede, formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo

β -(1,4), em que tais ligações guardam energia livre e podem ser quebradas para liberar açúcares fermentescíveis (Buckeridge, 2010). As moléculas de glicose unem-se formando o complexo cristalino microfibrila, extremamente compactada e desidratada, uma vez que suas ligações glicosídicas do tipo β necessitam de mais energia do que as ligações do tipo α para serem quebradas (Kerbaudy, 2008). A extremidade da cadeia de celulose onde se encontra o carbono anomérico livre é chamada de extremidade redutora, e a extremidade que o carbono anomérico não se encontra disponível é chamada de extremidade não redutora (Sandgren *et al.*, 2005).

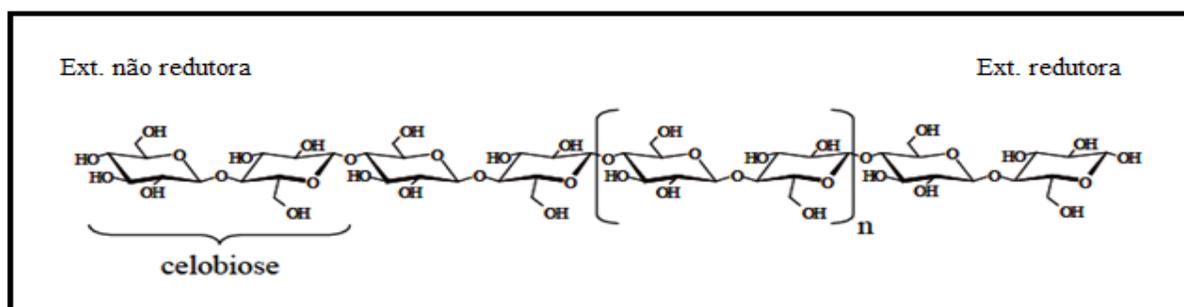


Figura 1. Representação da cadeia linear da celulose (Adaptada de Tímar-Balázsy e Eastop, 1998).

A hemicelulose é responsável pela orientação das microfibrilas de celulose devido à combinação de uma variedade de unidades monossacarídicas e ácidos urônicos (Figura 2). Nos materiais lignocelulósicos, ela está ligada à celulose e à lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material (Silva, 2009). As hemiceluloses constituintes variam nas plantas de acordo com o tipo de tecido vegetal e a espécie a que pertencem, sendo as principais encontradas: os xiloglucanos, os glucuronoarabinoxilanos (GAXs) e os mananos (Silva, 2005).

Para formar a parede celular, moléculas de celulose se alinham formando microfibrilas cristalinas organizadas em um arranjo espiral muito resistente (Figura 3). As hemiceluloses se aderem à superfície das microfibrilas formando um domínio celulose-hemicelulose. As hemiceluloses impedem que as moléculas de celulose de fibras paralelas colapsem entre si formando fibrilas muito grandes, permitindo uma interação fraca entre uma fibra e outra, de modo a formar uma rede. Esse domínio está imerso em um domínio formado por pectinas que determinam a porosidade da parede (Buckeridge *et al.*, 2008).

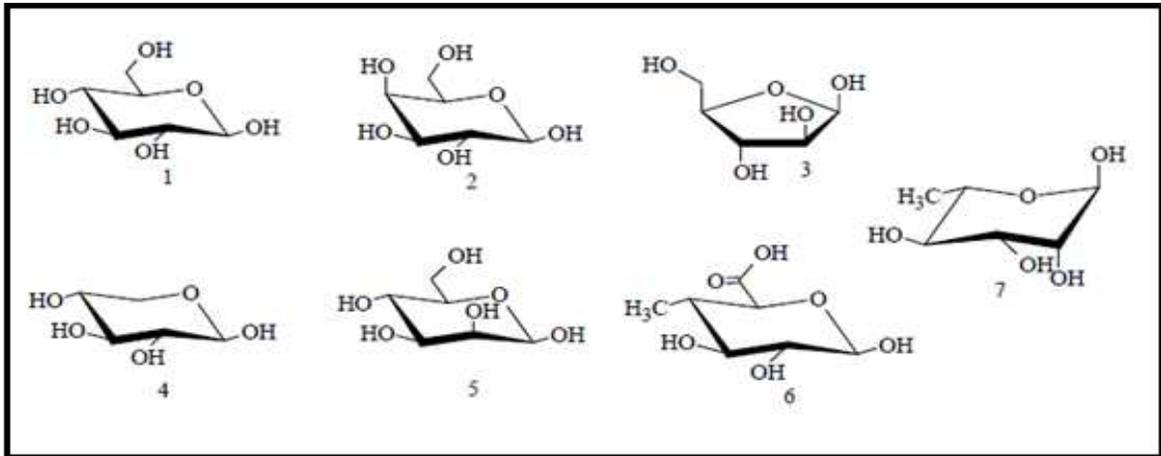


Figura 2. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1)D-glucose, (2)D-galactose, (3)L-arabinose, (4)D-xilose, (5)D-manose, (6)4-O-metil-D-glucurônico, (7) L-ramnose (Sjöström, 1999).

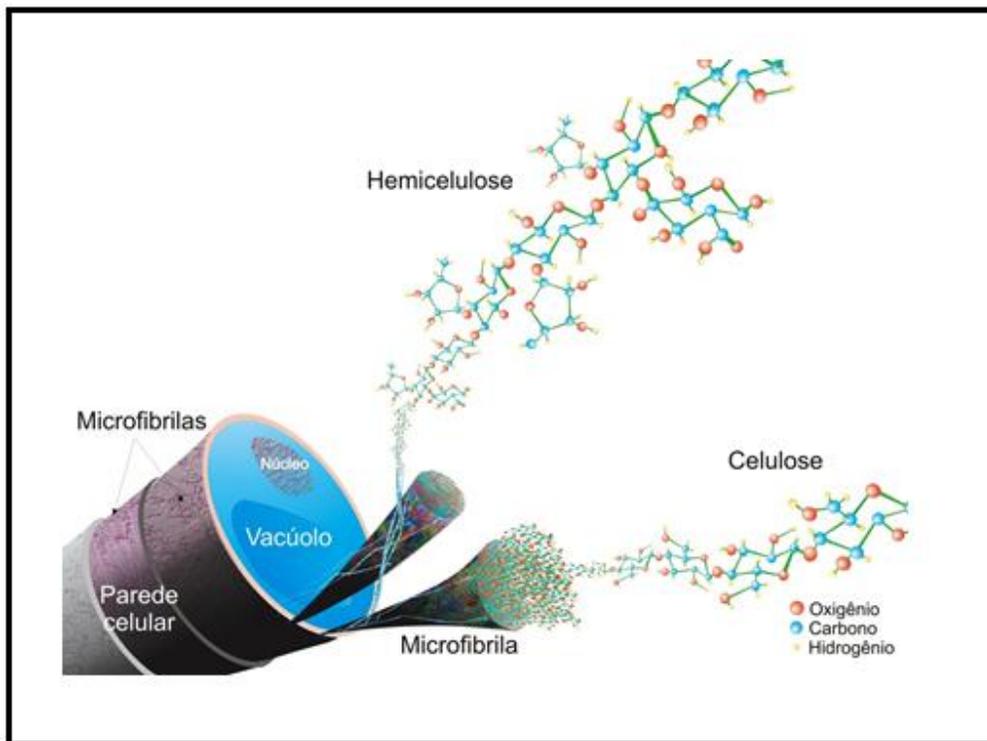


Figura 3. Estrutura de uma microfibrila (Buckeridge, 2010).

A parede celular da cana-de-açúcar é classificada em tipo II, como caracterizado por Carpita e Gibeaut (1993), e tem como principal hemicelulose os GAXs, polímeros ácidos que possuem uma cadeia carbônica principal de resíduos de xiloses unidas por ligações do tipo β -(1,4) e ramificados com arabinose através de ligações α -(1-2) e/ou α -(1-3). A cana também apresenta glucanos de ligação mista em sua composição, compostos de uma cadeia não ramificada de glicose com ligações β -(1,4), interrompida regularmente com ligações β -(1,3) (Saavedra *et al.*, 1988).

As paredes celulares do tipo II possuem grandes quantidades de compostos fenólicos associados e suas biossínteses são o resultado de um longo processo que é iniciado no citoplasma, através da via do chiquimato, ao qual são sintetizados fenilalanina e tirosina (dos Santos *et al.*, 2008). Através da via dos fenilpropanóides, rota enzimática exclusiva de vegetais, a fenilalanina é transformada em compostos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos.

A via dos fenilpropanóides (Figura 4) é iniciada pela deaminação da fenilalanina onde a reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) produzindo o ácido cinâmico. O segundo passo consiste na hidroxilação do ácido cinâmico através da enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H) formando o ácido *p*-cumárico, o primeiro composto fenólico da via. Alternativamente, a enzima tirosina amônia-liase (TAL) realiza a deaminação da tirosina formando diretamente o ácido *p*-cumárico. A enzima TAL é muito importante em caso de inibição na enzima PAL ou C4H. No passo seguinte ocorre a esterificação do *p*-cumarato à coenzima A, que é catalisado pela 4-cumarato: coenzima A ligase (4CL). Estes três passos, realizados pela PAL, C4H e 4CL, são conhecidos como a via geral dos fenilpropanóides. Ela controla o fluxo metabólico de compostos fenólicos para fenilpropanóides e derivados benzóicos (dos Santos *et al.*, 2008).

As enzimas PAL e TAL são consideradas enzimas regulatórias chaves e um dos principais pontos de controle do metabolismo secundário de vegetais, tendo suas atividades influenciadas por fatores externos e internos (hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos, ferimentos e invasão de fungos) o qual induzem a transcrição dos mRNA que codificam para essa enzimas, aumentando suas sínteses, conseqüentemente, estimulando a produção dos compostos fenólicos (Dias, 1995).

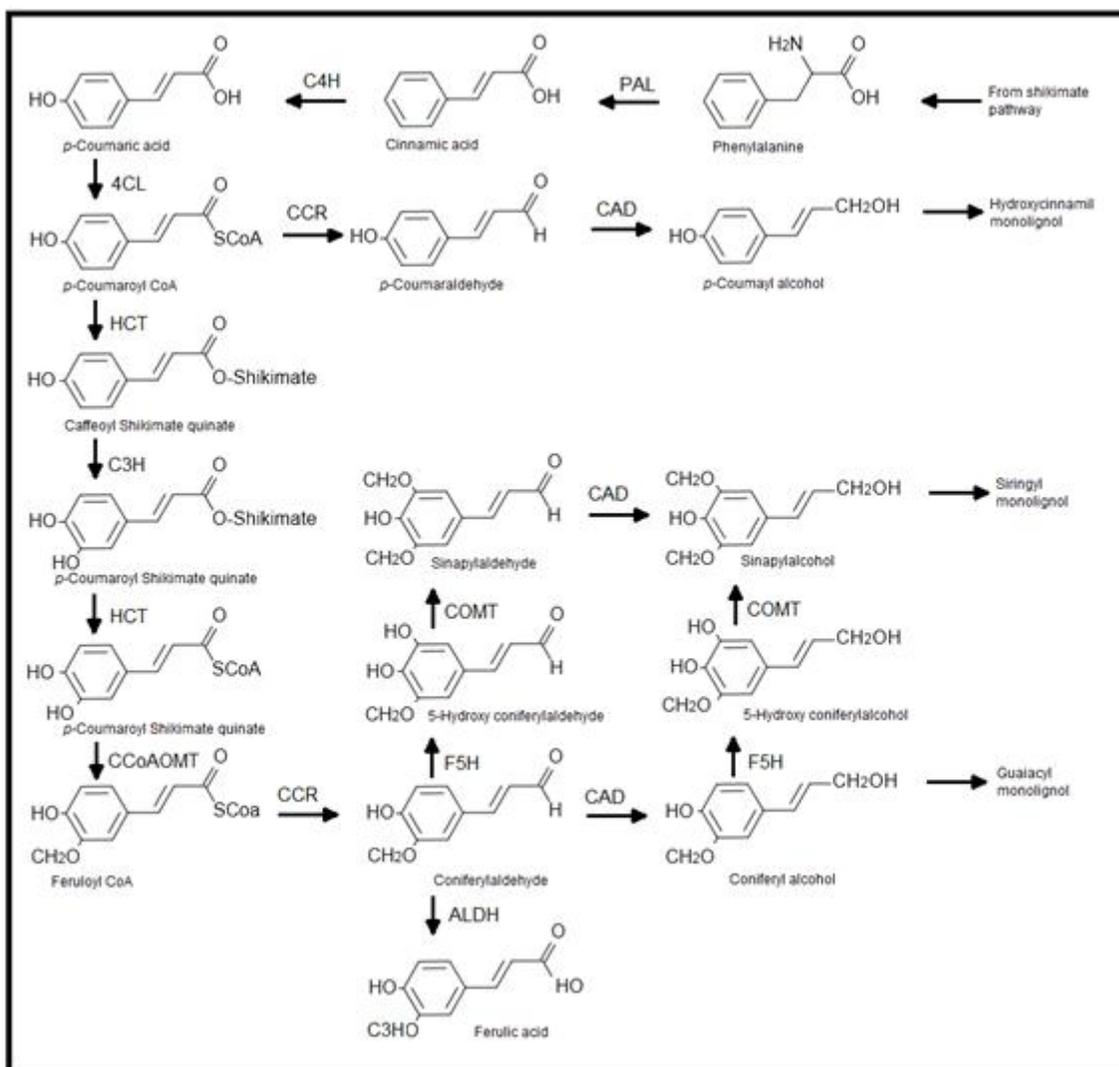


Figura 4. Esquema simplificado da via dos fenilpropanóides (Adaptada de dos Santos *et al.*, 2008).

Os ácidos hidroxicinâmicos fornecem rigidez à parede celular e limitam modificações posteriores das mesmas. Estes ácidos podem sofrer uma redução enzimática, formando os alcoóis sinapílicos, coniferílicos e cumarílicos que através de um processo oxidativo, podem se polimerizar formando a lignina, composto que interage com a parede celular secundária do sistema vascular das plantas, conferindo grande rigidez, cessando o alongamento celular (Fry, 1986) e ainda bloqueando o acesso de patógenos (Assabgui *et al.*, 1993).

O ácido ferúlico (3-metoxi-4-hidroxi-3-fenil-2-propenóico) pode representar até 3% do peso seco das paredes celulares das gramíneas (Kroon *et al.*,1999) e geralmente está esterificado na posição C-5 do arabinofuranosil das cadeias laterais de arabinoxilanos (Rumbold *et al.*, 2003) (Figura 5). O ácido ferúlico um importante componente para a biologia e estrutura da parede celular, já que pode ser acoplado (por oxidação mediada por peroxidases) formando uma grande variedade de dímeros que são responsáveis pelo “*cross linking*” de cadeias de polissacarídeos (Brett e Waldron, 1996).

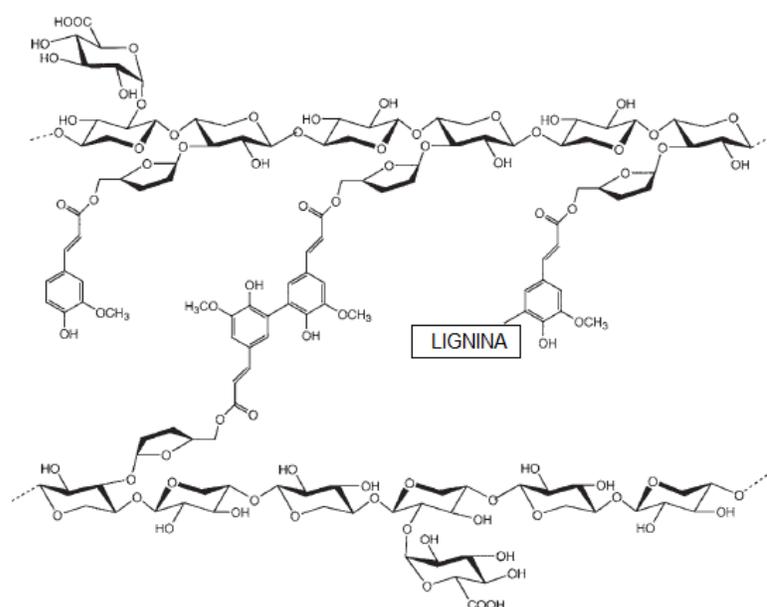


Figura 5. Glucuronoarabinoxilanos (GAXs) interligados por resíduos de ácido ferúlico esterificados a resíduos de arabinose de polissacarídeos adjacentes (Adaptada de Wong, 2006).

1.4. A obtenção do etanol de segunda geração: perspectivas e desafios

A obtenção de etanol a partir de biomassa envolve basicamente as etapas de hidrólise dos polissacarídeos, gerando mono e dissacarídeos e a fermentação dos monos e dissacarídeos em etanol (Siqueira, 2011). A hidrólise de celulose gera moléculas de glicose e celobiose. Por outro lado, a hidrólise de ligninas e hemicelulose geram açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a

fermentação alcoólica (Ogeda e Petri, 2010).

Os processos hidrolíticos ainda são um gargalo devido à complexidade das paredes celulares dos vegetais. Por esta razão, a biomassa necessita de um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose, a qual sofre tratamento específico para a obtenção de glicose. Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura baseando-se em processos mecânicos, físicos, químicos ou ainda a combinação deles. Os mais comuns baseiam-se na hidrólise ácida, alcalino oxidativo, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida e hidróxido de sódio (Ogeda e Petri, 2010).

Os tratamentos biológicos são apontados como alternativa para a degradação da biomassa lignocelulósica, uma vez que complexos enzimáticos produzidos por vários tipos de micro-organismos têm se demonstrado capazes de agir como catalisadores da hidrólise de celulose e hemicelulose, desempenhando papel importante na biosfera e participando do ciclo do carbono, através da reciclagem da celulose e da xilana (Lynd *et al.*, 2002; Siqueira, 2011). O fungo *Trichoderma reesei* é um exemplo de micro-organismo produtor de celulases que atuam sinergicamente (Figura 6) sobre a biomassa a fim de hidrolisá-la completamente (Medve, 1997).

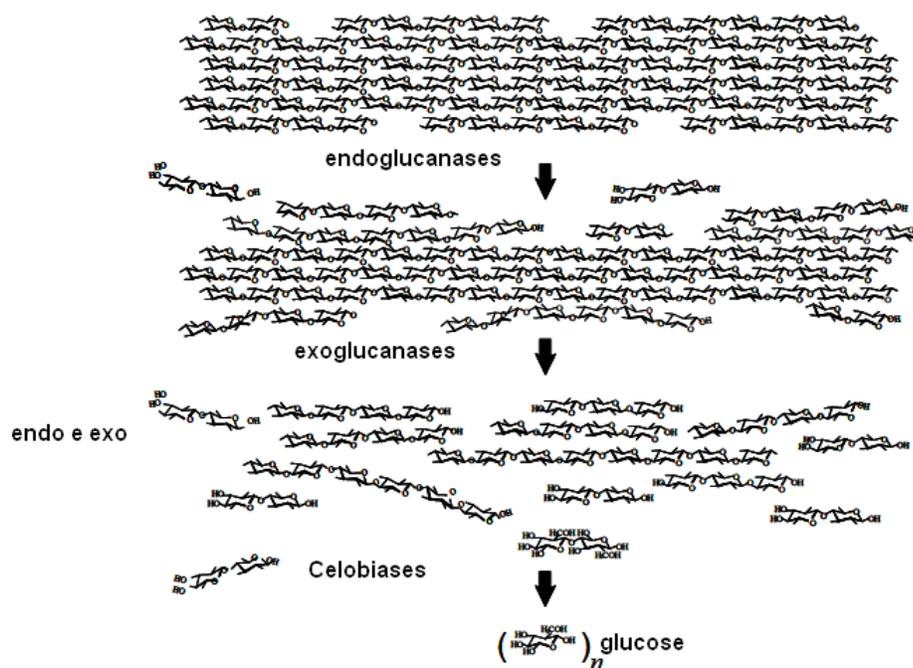


Figura 6. Modo simplificado de ação do complexo celulásico do *T. reesei*: As endo-1,4- β -glucanases atuam nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4). As celobio-hidrolases (exo-1,4- β -D-glucanases) atuam nos terminais reductores das cadeias de celulose, liberando D-celobiose. As “ β -D-glucosidasas” catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-glicose a partir da celobiose (Medve, 1997).

A degradação total da celulose requer a ação de um complexo multienzimático, chamado de sistema celulolítico e as enzimas que o compõe são denominadas hidrolases glicosídicas (Daroit, 2007).

Henrissat (1991) propôs um sistema de classificação para as hidrolases glicosídicas com base na similaridade estrutural e funcional partilhada ao nível da sua sequência primária. A classificação em famílias é baseada na similaridade do mecanismo de ação, dos resíduos catalíticos e da estrutura tridimensional (Henrissat, 1991; Henrissat e Davies, 1993: 1997) e estes dados estão disponíveis no banco de dados do CAZy (www.cazy.org) o qual abrange cerca de 300 famílias protéicas e as hidrolases glicosídicas estão atualmente classificadas em 130 famílias.

Antecedente ao sistema proposto por Henrissat (1991), a Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMC – International Union of Biochemistry and Molecular Biology) apresentou a nomenclatura expressa pelo número EC atribuído a cada enzima. Este número caracteriza a classe (1. oxido-redutase; 2. transferases; 3.

hidrolases; 4. liases; 5. isomerases; e 6. ligases), subclasse, ligação alvo da enzima, e substrato. Para as hidrolases glicosídicas (EC 3.2.1.x), os três primeiros dígitos indicam que hidrolisam ligações O-glicósido, sendo que o x indica o substrato.

O sistema celulolítico compreendem três classes de enzimas: endo-1,4- β -glicanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso diminuindo o comprimento das microfibrilas e gerando novas extremidades livres, ou seja, gerando oligômeros; exoglicanases (EC 3.2.1) ou celobiohidrolases (3.2.1.91) agem de maneira progressiva nas extremidades redutoras e não redutoras dos oligômeros gerados pelas endo-1,4- β -glicanases, liberando moléculas de celobiose; o grupo finalizador composto pelas 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.2.21) que hidrolisam celobiose a glicose (Lynd *et al.*, 2002; Aguiar e Ferraz, 2011).

Já a degradação total das frações de hemicelulose requer uma gama de enzimas que agem cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose e podem ser divididas, conforme Wong (2006), em dois grupos: o primeiro é composto pelas enzimas que clivarão a cadeia de xilano principal, as endo- β -xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidades (EC 3.2.1.37). O segundo grupo é composto por enzimas denominadas acessórias, que possuem a função de melhoramento da acessibilidade das endo- β -xilanases e β -xilosidades na ação de hidrólise. São elas: α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase, acetil xilano esterases (EC 3.1.1.6) ácido para-coumárico esterases, soleninas e feruloil esterases (EC 3.1.1.73).

As principais características sobre as três classes de enzimas empregadas na dissertação, endo-xilanase, arabinofuranosidase e feruloil esterase, serão descritas a seguir.

1.4.1. Endoxilanases

As endoxilanases são classificadas como glicosidases (O-glicosídeo hidrolases EC 3.2.1.x) e catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre os resíduos de xilose no xilano (Prade, 1995). As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação do xilano e seu modo de ação, características e produtos liberados variam de acordo com a sua origem, uma vez que podem ser produzidas em condições variadas por diferentes fungos e bactérias (Bastawde, 1992). De acordo com o sistema de classificação proposto por Henrissat e Bairoch (1993) as endoxilanases estão classificadas juntamente com as glicosil – hidrolases em famílias, de acordo com a similaridade da estrutura primária do domínio catalítico. Dentre as famílias descritas até o momento no banco de dados do CAZy

(www.cazy.org) as endoxilanases se encontram principalmente nas famílias 10 e 11, porém existem endoxilanases enquadradas nas famílias 5, 7, 8, e 43, onde os membros se diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturais, modo de ação e especificidade ao substrato. As xilanases pertencentes à família 11 são as mais estudadas e denominadas verdadeiras porque hidrolisam somente polímeros da xilose. Estas enzimas são mais ativas em xilooligossacarídeos de cadeias longas e apresentam fendas largas de ligação ao substrato (Collins *et al.*, 2005). Podem ser consideradas específicas quando hidrolisam somente as ligações β -1,4 dentro da cadeia principal de xilano ou não específicas quando hidrolisam ligações glicosídicas cruzadas do tipo β -1,4 de outros polímeros adjacentes. As endoxilanases hidrolisam o xilano a xilooligossacarídeos e xilobiose, substratos para a β -xilosidase (Coughlan, 1992) e constituem as principais hemicelulases comerciais em virtude do seu potencial nos grandes setores: têxtil, alimentício e rações animais (Bhat, 2000), bem como na fermentação da cerveja, extração de café e preparação de café solúvel, em detergentes e na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos (empregados como antimicrobianos ou antioxidantes) (Wong *et al.*, 1988, Kamal *et al.*, 2004).

Na indústria alimentícia, os xilooligossacarídeos (XOS) são obtidos através dos materiais lignocelulósicos a partir da hidrólise química, mas podem também serem obtidos de biomassa vegetal após tratamento enzimático com xilases e feruloil esterases. A utilização de XOS como ingredientes para alimentos funcionais é fundamentada nos seus benefícios a fisiologia da microflora intestinal. Oferecem vantagens, se comparados com os outros oligossacarídeos em termos de estabilidade e efeitos à saúde, como o estímulo ao crescimento de probióticos como o *Lactobacillus spp.*, juntamente à inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, promovendo uma série de benefícios ao sistema digestivo e imunológico (Meneses e Durrant, 2008; Chapla *et al.*, 2011).

Os microrganismos usados para obter xilanases são os fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp* e *Humicola insolens*. Entretanto, xilanases comerciais podem ser obtidas principalmente por várias bactérias de espécies diferentes de *Bacillus* (Said e Pietro, 2004).

1.4.2. Arabinofuranosidases

A α -L-arabinofuranosidase arabinofuranohidrolase (ABF) é uma enzima acessória envolvida na liberação de resíduos de L-arabinofuranose substituídos nas posições 2 e 3 dos

resíduos de xilose da cadeia central de arabinoxilanos, arabinanas, arabinoglucuronoxilano e arabinogalactanas, podendo ser produzidas por fungos, bactérias e plantas (Kaji, 1984).

De acordo com o sistema de classificação proposto por Henrissat e Bairoch (1993) as arabinofuranosidades estão classificadas juntamente com as glicosil – hidrolases em famílias, de acordo com a similaridade da estrutura primária do domínio catalítico. Dentre as famílias descritas até o momento no banco de dados do CAZy (www.cazy.org) esta classe de enzimas é encontradas nas famílias 43, 51, 54 e 62 e podem hidrolisar ligações glicosídicas com inversão líquida (GH 43) ou retenção (GH 51 e 54) da configuração estereoquímica do carbono anomérico (Dodd *et al.*, 2009). Podem também ser divididas nos subgrupos A e B, onde ABF do tipo A é ativa em oligômeros de arabinose e em p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (pNP-ara), mas não é ativa em polímeros de arabinose. Já subgrupo B é ativo em pNP-ara e polímeros de arabinose da beterraba, agindo preferencialmente em resíduos de arabinose conectados por ligações α -1,3 em relação aos conectados por ligações α -1,5 (Kühnel *et al.*, 2010).

1.4.3. Feruloil esterases

Esta classe de enzimas vem recebendo atenção na área da pesquisa nos últimos dez anos em virtude da sua importância no pré-tratamento de biomassa para produção de etanol e na sua ampla aplicação nas indústrias químicas, alimentação animal, alimentícia e farmacêutica (relacionada ao ácido ferúlico liberado após sua hidrólise), e ainda na indústria de papel. Os dados crescentes de publicações anuais sobre FAE do ano de 2000 (aproximadamente 5 publicações) até 2008 (aproximadamente 28 publicações) evidenciam os esforços no sentido de entender melhor essa classe de enzimas, bem como seu modo de ação, sua classificação e aplicações (Fazary e Ju, 2008).

Feruloil esterases compreendem a uma subclasse de carboxilesterases (EC 3.1.1.1) onde incluem cinamoil esterases e hidrolases de ácido cinâmico e podem ser divididas em dois grandes grupos, A e B, baseada na sua especificidade para hidrolisar dímeros de ácido ferúlico em substratos esterificados (Kroon *et al.*, 1999).

Feruloil esterases do tipo A clivam ácido ferúlico proveniente de ligações éster 1-5 de arabinose feruluilada e em baixo rendimento, na presença de xilanase, os dímeros 8-O-4 diFA e 5-5' diFA. Este tipo de feruloil esterase age preferencialmente em substratos hidrofóbicos com substituintes volumosos sobre o anel benzênico e substituições metoxi no carbono 3 ou 5 do anel,

o que explica sua especificidade para o ácido ferúlico. Possuem atividade em substratos sintéticos como metil ferulato, metil sinapato e metil *p*-cumarato, mas não em metil cafeato, e geralmente são induzidas no crescimento de micro-organismo em substratos derivados de cereais (Crepin *et al.*, 2003; Kroon *et al.*, 1999)

Feruloil esterases do tipo B possuem a capacidade de hidrolisar eficientemente ligações 1-5 e 1-2 de oligossacarídeos ferulilados e ainda ácido ferúlico ligado a arabinose na posição C-2, porém são incapazes de hidrolisar formas diméricas de ferulatos. Este tipo age preferencialmente em substratos mais hidrofílicos com substituintes menos volumosos no anel benzênico. Os dímeros de ácido ferúlico são mais hidrofóbicos que o ácido ferúlico monomérico, e uma vez que a substituição tem por finalidade a adição de um constituinte volumoso ao anel benzênico, explica porque FAEs do tipo B não têm capacidade de hidrolisar dímeros de ácido ferúlico. Possuem atividade em substratos sintéticos como metil cafeato, metil ferulato e metil *p*-cumarato, mas não em metil sinapato e são preferencialmente secretadas pelo crescimento do micro-organismo em polpa de beterraba (Kroon *et al.*, 1999; Crepin *et al.*, 2003; Wong, 2006).

Dentre as feruloil esterases descritas na literatura, duas já foram identificadas na ação de liberação de dímeros de ácido ferúlico: denominadas FAEA do fungo *Aspergillus niger* e XyID da bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Elas mostraram ação na clivagem do dímero de ácido ferúlico 5-5' diFA na parede celular de trigo e cevada com ou sem adição de xilanases (Kroon *et al.*, 1999).

Além da classificação geral em feruloil esterase tipo A ou B, existe também uma subclassificação em A, B, C, D proposta por Crepin *et al.* (2003) baseada na similaridade da atividade de esterase em substratos sintéticos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e na similaridade de suas sequências de aminoácidos com lipases, acetil xilano esterases, clorogenato esterases e xilanases e ainda o preferencial meio de indução (Crepin *et al.*, 2003; Wong, 2006). Estudos sobre sequência, estruturas e propriedades bioquímicas se fazem necessárias para fundamentar essa subclassificação proposta. A Tabela 1 apresenta algumas feruloil esterases descritas na literatura e classificadas conforme Crepin *et al.* (2003).

A maioria das feruloil esterases microbianas são secretada para o meio de cultura (Fazary e Ju, 2007). Sabe-se que mono e dissacarídeos (como glicose, xilose, lactose, maltose e xilitol) não induzem a produção destas enzimas, mas substratos complexos (como o farelo de trigo e

milho ou polpa de beterraba) induzem, e têm sido utilizados como forma eficiente de sua produção (Donaghy e Mckay, 1995; Bartolome *et al.*, 2003; Mathew e Abraham, 2005). O meio de indução escolhido é que definirá o tipo que será preferencialmente induzida e, portanto, secretada (Fazary e Ju, 2007).

Tabela 1: Classificação de algumas feruloil esterases descritas na literatura.

	TIPO DA FAE			
	A	B	C	D
Micro-organismo	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stipitatus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Nome	FAE-A	FAE-B	FAE-C	XYLD
Meio de indução preferencial	farelo de trigo e xilano de aveia	polpa de beterraba	polpa de beterraba a farelo de trigo	farelo de trigo
Substratos metilados (capacidade de hidrólise)	Metil ferulato Metil sinapato Metil <i>p</i> -cumarato	Metil ferulato	Metil ferulato Metil sinapato Metil <i>p</i> -cumarato Metil cafeato	Metil ferulato Metil sinapato Metil <i>p</i> -cumarato Metil cafeato
Liberação de dímeros de AF	apenas 5-5' -DiAF	Nenhum	Nenhum	apenas 5-5' -DiAF
Similaridade na sequência de aminoácidos	Lipases	Acetil xilano esterases	Clorogenato esterases e tanases	Xilanases
Referências	Kroon <i>et al.</i> , 1999	Kroon <i>et al.</i> , 2000	Crepin <i>et al.</i> , 2003	Ferreira <i>et al.</i> , 1993

*Adaptada de Fazary e Ju (2007)

Mais de 30 feruloil esterases já foram purificadas e caracterizadas a partir de vários micro-organismos, incluindo fungos e bactérias, mostrando que há variações significativas no peso molecular (29 a 210 kDa), ponto isoelétrico (3.0 a 9.5) e condições ótimas de reação hidrolítica (pH ótimo na faixa de 4.0 a 8.0 e termoestabilidade na faixa de 30 a 65 °C) (Topakas *et al.*, 2003; Fazary e Ju, 2007) mas como ainda não foi estabelecida uma correlação entre suas características físicas com suas condições de reação ideais, existe a necessidade de um estudo

aprofundado na caracterização bioquímica em relação à suas seqüências de aminoácidos e estrutura 3D (Moukouli *et al.*, 2008).

A Figura 7 apresenta a estrutura de alguns substratos sintéticos e os ácidos formados após a ação de hidrólise da feruloil esterase e a Figura 8 mostra a atividade específica relativa (%) de algumas feruloil esterases provenientes de diferentes microrganismos nos diferentes substratos sintéticos empregados para as classificações descritas na literatura.

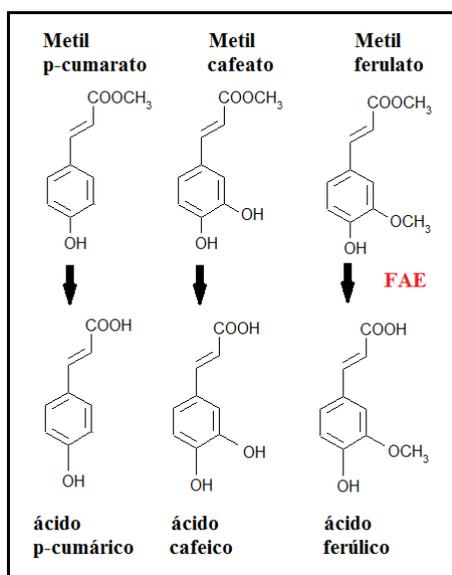


Figura 7. Estrutura química dos substratos sintéticos Metil p- cumarato, Metil cafeato e Metil ferulato e os produtos formados após a hidrólise da feruloil esterase, os ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico.

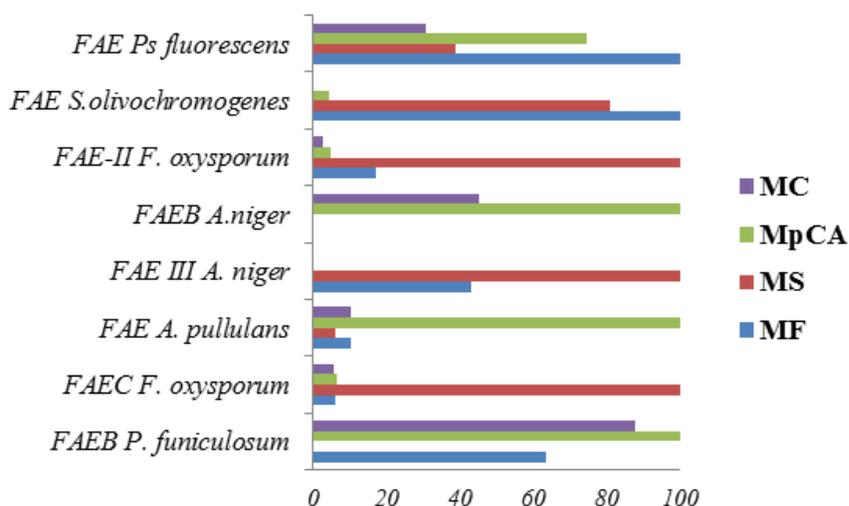


Figura 8. Atividade específica relativa (%) de FAEs de diferentes microorganismos em diferentes substratos: MC (metil cafeato), MpCA (metil *p*-cumarato), MS (metil sinapato) e MF (metil ferulato) (Ferreira *et al.*, 1993; Faulds *et al.*, 1994; Faulds *et al.*, 1995; Kroon *et al.*, 2000; Topakas *et al.*, 2002; Rumbold *et al.*, 2003; Lévassieur *et al.*, 2004; Moukouli *et al.*, 2008).

A disponibilidade crescente da seqüência do genoma de microorganismos, associada com a bioinformática que é uma poderosa ferramenta, vêm contribuindo e permitindo a descoberta de novas feruloil esterases de diferentes microorganismos, como por exemplo, *Aspergillus nidulans* (Shin e Chen, 2007), *Neurospora crassa* (Crepin *et al.*, 2004), *Fusarium oxysporum* (Moukouli *et al.*, 2008) e *Aspergillus clavatus* (Damásio *et al.*, 2012).

Os organismos hospedeiros mais utilizados para a expressão heteróloga de proteínas são: a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Embora tenham se mostrado eficientes em alguns casos, os sistemas de expressão em *S. cerevisiae* e em *P. pastoris* apresentam forte tendência a hiperglicosilação da proteína de interesse. Feruloil esterases heterólogas expressas em *Escherichia coli* podem sofrer modificação pós traducionais, e como consequência, são expressas em corpos de inclusão (Benoit *et al.*, 2007)

Para o emprego de enzimas em grande escala na indústria, é necessário o desenvolvimento de estratégias que visem a super expressão dessas proteínas de forma recombinante. Linhagens recombinantes de *Aspergillus ssp* (fungo filamentoso), apresentam um grande potencial para a produção de enzimas recombinantes (Squina *et al.* 2009; Fleissner e Dersch, 2010).

1.5. Os radicais livres e os antioxidantes

Os radicais livres podem ser considerados moléculas orgânicas ou inorgânicas que contêm um ou mais elétrons não pareados com existência independente. São moléculas instáveis com meia vida curta e muito reativas. Encontradas em todos os sistemas biológicos, sua geração é uma ação contínua e fisiológica, podendo ser por fontes endógenas ou exógenas. A atividade de oxidases, desidrogenases, peroxidases, a presença de metais de transição no interior da célula, dão origem aos radicais livres e são consideradas fontes endógenas. O tabaco, a poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas, radiações gama e ultravioleta são exemplos de fontes exógenas (Halliwell, 1994; Soares, 2002).

O estímulo exagerado na produção dessas espécies passam a ser nocivo para o organismo, podendo desencadear uma série de doenças crônicas degenerativas como artrite, aterosclerose, diabetes, catarata, inflamações crônicas, disfunção cerebral, envelhecimento, câncer, dentre outras (Bianchi e Antunes, 1999; Halliwell, 1994).

Do ponto de vista químico, antioxidante é um conjunto heterogêneo de substâncias que, presente em baixas concentrações quando comparado a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz, podendo ser classificados em: (1) primários, (2) sinergistas, (3) removedores de oxigênio, (4) biológicos, (5) agentes quelantes e (6) oxidantes mistos, de acordo com seu modo de ação (Sies e Stahl, 1995).

As substâncias antioxidantes podem ser divididas em sintéticas ou naturais. Os antioxidantes sintéticos mais empregados pela indústria alimentícia para evitar a reações deteriorativas nos alimentos são os polifenóis butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Porém este emprego é limitado, uma vez que podem apresentar atividades mutagênicas (Osawa *et al.*, 1990).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. Os estudos estão centralizados nos compostos fenólicos de origem vegetal, pois eles agem como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes (Soares, 2002; Oliveira *et al.*, 2009).

1.6. Os antioxidantes naturais

As substâncias fenólicas contribuem para as propriedades sensoriais tais como: cor, aroma, adstringência de frutas, mel, bebidas e vegetais. Considerados metabólitos secundários de plantas, as substâncias fenólicas são formadas em condições de estresse da planta como radiação UV e ataque por patógenos (Angelo e Jorge, 2007). Desta forma, várias matrizes são estudadas como fontes de antioxidantes naturais potencialmente seguros em substituição aos artificiais. Além do baixo custo de obtenção, possuem alta eficiência frente aos antioxidantes sintéticos empregados na indústria de alimentos tais como, ácido ascórbico e tocoferóis. Dos vários compostos que tem sido isolados e estudados, uma ampla faixa de polifenóis de plantas apresentam propriedades antioxidantes, sendo propostos para proteção contra a oxidação lipídica (Moure *et al.*, 2001).

Existem cerca de seis mil estruturas conhecidas de fenóis (Lee *et al.*, 2005), desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, destacando-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (Shahidi e Naczk, 1995). Ribéreau-Gayon (1968) adotou a seguinte classificação para estes compostos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza. No grupo dos compostos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol e aldeídos derivados dos ácidos benzóicos. Já os taninos e ligninas são compostos fenólicos que se apresentam sob a forma de polímeros. O grupo dos compostos largamente distribuídos na natureza é subdividido em duas famílias: (1) Os flavonóides e derivados e (2) ácidos fenólicos e cumarinas (Soares, 2002).

Nos alimentos, os ácidos fenólicos podem ser encontrados livres ou esterificados. O ácido cafeico, por exemplo, é geralmente o ácido fenólico mais abundante e representa entre 75 e 100% do total do conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos da maioria das frutas enquanto o ácido ferúlico é o mais abundante ácido em grãos cereais. O seu conteúdo em grão de trigo é aproximadamente 0,8- 2 gramas. kg⁻¹ peso seco, o que pode representar até 90% do total de polifenóis. (Manach *et al.*, 2004). Os ácidos fenólicos são classificados como antioxidantes primários e sua eficiência em atuar como antioxidante é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (Angelo e Jorge, 2007).

Pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos. Enfrentam também problemas metodológicos empregados por se tratar de uma gama enorme de substâncias que são, na maioria das vezes de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis à ação enzimática (King e Young, 1999).

Tem se observado um grande número de relatos sobre agentes antioxidantes e sua ação positiva sobre a proliferação de células cancerígenas. A grande maioria desses estudos refere-se aos antioxidantes polifenólicos, por serem ativos em doenças crônicas degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer. O uso de antioxidantes polifenólicos derivados de alimentos tem sido descritos na literatura, porém os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não são muito claros (Angelo e Jorge, 2007).

1.7. Ácido ferúlico: potenciais e aplicações biotecnológicas

Nos últimos 30 anos, houve um aumento considerável no número de publicações sobre ácido ferúlico, relacionadas com suas funções fisiológicas e terapêuticas, suas aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica, bem como seus produtos relacionados (Ou e Kwok, 2004; Fazary e Ju, 2008) como pode ser visualizadas na Figura 9.

O ácido ferúlico é um dos ácidos fenólicos mais abundantes nas plantas, podendo chegar a concentrações de 9 g.kg⁻¹ em polpa de beterraba e 50 g.kg⁻¹ em farelo de trigo (Rosazza *et al.*, 1995).

No bagaço de cana, a concentração de ácido ferúlico pode chegar a 5,6 g.kg⁻¹, o que corresponde a 0,56% da composição total do material, conforme descrito por Deschamps e Ramos (2002) utilizando detergente neutro para o processo de extração. Posteriormente, Ou *et al.* (2007) empregando o método de hidrólise alcalina para a extração, determinou que a porcentagem de ácido ferúlico presente no bagaço de cana variava entre 1,36% a 2,58% da composição, comprovando que este material é uma fonte renovável adequado para obter ácido ferúlico.

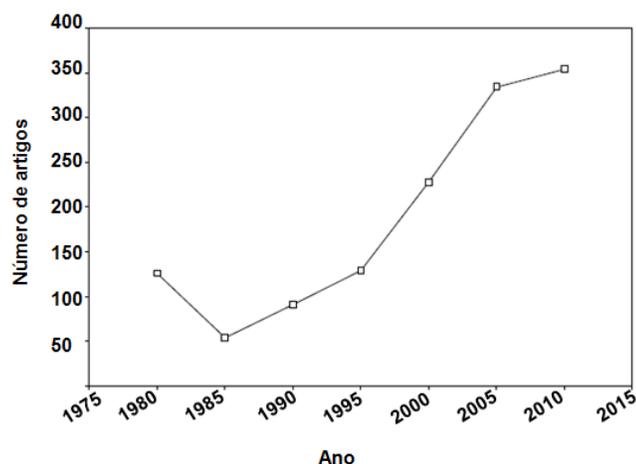


Figura 9. Publicações anuais sobre ácido ferúlico (adaptado de Fazary e Ju, 2008).

A capacidade antioxidante do ácido ferúlico pode ser atribuída à presença da hidroxila existente na posição orto com o grupo metoxila, doador de elétrons, fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil e aumenta a eficiência antioxidante do composto. A presença de uma segunda hidroxila na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante (Chen e Ho, 1997). O efeito seqüestrante do radical hidroxil parece estar diretamente relacionado aos grupos hidroxil localizados na posição para no anel aromático (Degáspari *et al.*, 2004).

Os estudos relatados envolvendo o ácido ferúlico e os seus derivados mostram que estes compostos fenólicos são antioxidantes eficazes e, como consequência desta propriedade, apresentam atividade antimicrobiana e antiinflamatória, efeitos hepatoprotetores e neuroprotetores, inibição no desenvolvimento de alguns tipos de câncer, controle do diabetes e níveis de colesterol e também como protetor da radiação gama e ultravioleta. Há um interesse científico emergente na busca de alternativas para os tratamentos químicos na prevenção e tratamento de doenças, tais como a utilização de produtos naturais, funcionais e emprego de antioxidantes naturais em substituição aos antioxidantes sintéticos.

O ácido ferúlico tem sido proposto para o tratamento de várias doenças, no entanto, a grande quantidade de estudos *in vitro* e em roedores como a falta de estudos disponíveis em seres humanos não permitem prever o verdadeiro papel citoprotector deste ácido nas doenças humanas. A investigação clínica do ácido ferúlico, assim como a biodisponibilidade e a sua utilização no tratamento e prevenção em doenças humanas necessita ser potenciado, contribuindo para que ele

se torne um suplemento nutricional, possa ser administrado oralmente sob a forma livre ou ligados a açúcares, e também ser utilizadas como aditivos em alimentos e loções fotoprotetoras.

O ácido ferúlico pode ser preparado pela reação de condensação entre a vanilina e ácido malônico catalizada por piperidina, porém esse método produz uma mistura de trans e cis-isômeros e necessita de um tempo de reação de três semanas (Adams e Bockstahler, 1952). Utilizando benzilamina como catalizador e metilbenzeno como solvente a uma temperatura de 85-95 °C, a produtividade do método aumenta e o tempo de reação é reduzido para duas horas, conforme descrito por Da e Xu (1997). Porém quando produzido biotecnologicamente a partir de fontes renováveis empregando extratos enzimáticos contendo feruloil esterases, o ácido ferúlico é considerado um produto natural (Faulds *et al.*, 1997).

Visando aplicação na indústria alimentícia, o ácido ferúlico apresenta potencial para aumentar a viscosidade de alimentos, pois tem a capacidade de formar ligações cruzadas com as cadeias poliméricas de proteínas ou polissacarídeos de baixo peso molecular, através de reações de oxidação controlada formando géis (Ou e Kwok, 2004).

Além de todo potencial terapêutico do ácido ferúlico e sua aplicação na indústria alimentícia, existe uma terceira área promissora: sua conversão em vanilina mediada por microrganismos (Fazary e Ju, 2007).

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), tradicionalmente conhecida como o “aroma de baunilha” é um composto cristalino de cor branca, obtida tradicionalmente da vagem de uma orquídea tropical, a *Vanilla planifolia* na forma de gluco-vanilina (na proporção de 2% em peso), fazendo dela a única orquídea de interesse comercial fora do contexto ornamental (Pacheco e Damasio, 2010).

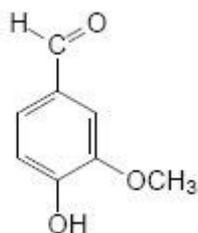


Figura 10. Estrutura química da Vanilina.

A vanilina é um dos aromatizantes mais importantes, sendo largamente utilizada em alimentos, bebidas, perfumes, cosméticos e fármacos (Daugusch e Pastore 2005), pois apresenta propriedades antioxidante, antimicrobiana, conservante e antimutagênico (Pacheco e Damasio, 2010).

Das 12.000 toneladas de vanilina que são produzidas anualmente apenas 1% desta vanilina é extraída da planta, sendo o restante sintetizado. Os preços da vanilina natural são bem maiores que o da vanilina sintética: variam de US\$ 1.200 a 4.000 o quilo, enquanto que preço da vanilina sintética é US\$ 15 o quilo (Lomascolo *et al.*, 1999).

A maior parte da vanilina sintética é produzida por meio do uso de precursores derivados do petróleo, tais como o guaiacol e o p-cresol. Essa rota é mais econômica, gera menos efluente e os rendimentos das reações são maiores (Hocking, 1997). Porém, para suprir a demanda mundial crescente do uso desta molécula, é necessário o desenvolvimento de vias alternativas dentre as citadas até o momento. Deste modo, a biotecnologia se apresenta como uma poderosa ferramenta para aumentar a produção de vanilina.

Assim como o ácido ferúlico, a vanilina produzida por meio de processos biotecnológicos é considerada um produto natural, pois é oriunda de compostos de fontes renováveis e com custos relativamente baixos se comparados ao processo de extração da vanilina natural. A produção biotecnológica da vanilina ocorre mediante o uso de extratos enzimáticos brutos ou enzimas purificadas produzidas principalmente por microrganismos ou plantas ou ainda por culturas de células. Diversos estudos demonstraram essas formas de produção biotecnológica da vanilina. Dentre as moléculas precursoras, pode-se citar vanilil-amina, extraída da pimenta, o ácido vanílico, isoeugenol, eugenol e o ácido ferúlico. Estudos do processo fermentativo do ácido ferúlico, empregando-se o microrganismo *Amycolatopsis*, mostraram que foi possível produzir vanilina em concentração de 11,5 g/L. A Kraft General Foods descreveu um processo no qual conseguiram produzir 210 mg/L de vanilina a partir do ácido ferúlico utilizando *Pseudomonas putida* ATCC 55180 (Daugusch e Pastore, 2005).

Uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* (BF13) foi desenvolvida com sucesso para biosíntese da vanilina a partir de ácido ferúlico. A manipulação genética dos estágios iniciais do ácido ferúlico na via catabólica do microorganismo associada com condições de cultivo otimizadas, resultou na produção de vanilina na concentração de 1,28 g/L, valor ainda não

relatado na literatura por cepas recombinantes de *P.fluorescens*. Os autores afirmam que são necessárias melhorias no processo empregando tecnologia adequada para que valores maiores sejam alcançados, como o uso de membranas de fibra oca e dispositivos que removam a vanilina produzida continuamente (Gioia *et al.*, 2011).

Existe um imenso campo a ser explorado, no que diz respeito à produção biotecnológica da vanilina: uma molécula de alto valor agregado obtida a partir de uma molécula abundante na natureza, o ácido ferúlico. Porém há uma gama de micro-organismos potenciais a serem estudados que somados à tecnologia disponível da engenharia genética tornará o processo biotecnológico atraente para as indústrias.

1.8. Referências

Adams, R.; Bockstahler, T. E. Preparation and reaction of hydroxycinnamic acids and esters. *J. American Chem. Soc.*, v. 74, p.5346–5348, 1952.

Aguiar, A.; Ferraz, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Química Nova*, v. 34, p.1729-1738, 2011.

Angelo, P. M.; Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 66, p.1-9, 2007.

Assabgui, R. A.; Rei, L.M.; Hamilton, R.I.; Arnason, J.T. Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium gramineum*. *Phytopathology*, v. 83, p.949-953, 1993.

Bartolome B.; Faulds, C. B.; Kroon, P. A.; Waldron, K.; Gilbert, H. J.; Hazlewood, G.; Williamson, G. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* esterase (XylD) release a 5-5-ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl Environ Microbiol*, v. 63, p.208–212, 1997.

Bastawde, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.*, v.8, p.353-368, 1992.

Benoit, I.; Coutard, B.; Oubelaid, R.; Asther, M.; Bignon, C. Expression in *Escherichia coli*, refolding and crystallization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase A using a serial factorial approach. *Protein Exp. Purification*, v. 55, p.166-174, 2007.

Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Advances*, v.18, p.355-383, 2000.

Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v.12, p.123-130, 1999.

Brett, C.T.; Waldron, K. Cell wall formation. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, Brett C.T. and Waldron K., eds (London: Chapman & Hall), p.75-111, 1996.

Buckeridge, M. S.; Santos, W. D.; Souza, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Edgard Blucher, p.365-380, 2010.

Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M. Structural models of primary cell walls flowering plants:

Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, v.3, p.1-30, 1993.

Castro, A. M.; Pereira Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p.181-188, 2010.

Chapla, D.; Pandit, P.; Shah, A. Production of xylooligosaccharides from corn cob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology*, v.115, p.215-221, 2012.

Chen, J.H.; Ho, C-T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem*, v.45, p.2375-2378, 1997.

Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. Xylanases, Xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.29, p.5-23, 2005.

Coughlan, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: Xylans and xylanases. (Visser, J.; Beldman, G.; Kusters-van Someren, M.A.; Voragen, A.G.J., eds.), p.111-139, Elsevier, Amsterdam, 1992.

Crepin, V. F.; Faulds, C. B.; Connerton, I. F. Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63, p.567-570, 2004.

Crepin, V. F.; Faulds, C. B.; Connerton, I. F. Production and characterisation of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: identification of the nucleophilic serine. *Protein Express Purif*, v.29, p.176-184, 2003

Da, Y. F.; Xu, Y. P. Synthesis of *trans*-ferulic acid. *Chinese J. Pharm.*, v. 28, p.188-189, 1997.

Dairot, D. J. Caracterização de uma B-Glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2007.

Damásio, A. R. L.; Pinto, C. M. B.; Brenelli, L.B.; Citadini, A. P.; Mandelli, F.; Cota, J.; Almeida, R.F.; Salvador, V.H.; Paixão, D.A.A.; Segato, F.; Mercadante, A. Z.; Neto, M. O.; dos Santos, W.D; Squina, M.F. Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2012. In press.

Daugusch, A.; Pastore, G. Obtenção da vanilina: oportunidade biotecnológica. *Química Nova*, v. 28, p.642-645, 2005.

Degáspari, C. H.; Waszczyński, N.; Santos, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*). Visão acadêmica, v.5, 2004.

Deschamps, F. C.; Ramos, L. P. Método para determinação de ácidos fenólicos na Parede Celular de forragens. *Rev. Brasileira de Zootecnia*, v.31, p.1634-1639, 2002.

Dodd, D.; Cann, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob Change Biol Bioenergy*, v.1, p.2-17, 2009.

Donaghy, J. A.; McKay, A. M. Measurement of feruloyl/p-coumaroyl esterase by capillary zone electrophoresis. *World J. of Microbiology & Biotechnology*, v.11, p.160-162, 1995.

Dos Santos, W. D. Ferrarese, M. L. L., Ferrarese-Filho, O. Ferulic Acid: An Allelochemical Troublemaker. *Functional Plant Science and Biotechnology*, v. 2, p.1-22, 2008.

Falch, E. A. Industrial enzymes-developments production and application. *Biotech. Advances*. v. 9, p.643-658, 1991.

Farina, E.; Zylbersztajn, D. (Org.). Competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar. São Paulo, SP: PENSA/FIA/, 1998.

Faulds, C.B.; Williamson, G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase

(FAE-III) from *Aspergillus niger*: Specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. **Microbiology**, v.140, p.779-787, 1994.

Faulds, C.B.; Williamson, G. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.1082-1087, 1995.

Fazary, A. E.; Ju, Y. H. Feruloyl Esterases as Biotechnological Tools: Current and Future Perspectives. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 39, p.811-828, 2007.

Fazary, A. E.; Ju, Yi-Hsu. The large scale use of Feruloyl Esterases in industry. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v.3, p. 95-110, 2008.

Fengel, D.; Wegener, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

Ferreira, L. M. A.; Wood, T. M.; Williamson, G.; Faulds.; Hazkewood, G.P.; Black, G.W.; Gilbert, H. J. A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a non-catalytic cellulose-binding domain. **J. de Biochemistry**, v.343, p. 215-224, 1993.

Fleissner, A.; Dersch, P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.1255-1270, 2010.

Fry, S. C. In vivo formation of xyloglucan monosaccharide: a possible biologically active cell wall fragment. **Plant**, v.169, p.443-453, 1986.

Furtado, A.T.; Scandiffio, M. I. G. Álcool no Brasil, uma longa história. **Scientific American (Brasil)**, v. 53, p.66-71, 2006.

Goldemberg, J. Em *Bioenergia no Estado de São Paulo*; Nigro, F. E. B.; Coelho, S. T., eds.; Imprensa Oficial do Estado de São Paulo: São Paulo, 2008, p. 110; World Energy Assessment - WEA 2000; *Energy and the challenge of sustainability*, United Nations Development Programme, United Nations Development of Economic and Social Affairs and World Energy Council.

Halliwell, B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry J.**, v.280, p.309-316, 1991

Henrissat, B.; Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **J. Biochem**, v.293, p.781-788, 1993.

Henrissat, B.; Davies, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v.7, p.637-644, 1997.

Hocking, M. B. Vanillin: Synthetic Flavoring from Spent Sulfite Liquor. **J. Chem. Educ**, v.74, p.1055, 1997.

Kaji, A. L-Arabinosidases. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem**, v.42, p. 383-394, 1984.

Kamal-Kumar, B.; Balakrishnan, H.; Rele, M.V. Compatibility of alkali xylanases from an *alkaliphilic Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergent and proteases. **J. of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.83-87, 2004.

Kerbauy, G. B. Fisiologia vegetal. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2008. 431 p.

King, A.; Young, G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals, v.99, p.213-218, 1999.

Kroon, P.A.; Garcia Cones, M.T.; Fillingham, I. J; Williamson, G. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, p.428-434,

1999.

Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N. M.; Archer, D.B; Belshaw, N. J. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. **J. Biochemistry**, v.267, p. 6740-6752, 2000.

Kuhnel, S.; Hinz, S. W.; Pouvreau, L.; Wery, J.; Schols, H.A.; Gruppen, H. *Chrysosporium lucknowense* arabinohydrolases effectively degrade sugar beet arabinan. **Bioresour Technol**, v.101, p. 8300-8307, 2010.

Laufenberg, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, p. 167-198, 2003.

Lee S, J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p.131-137, 2005.

Leite, R. C. C.; Leal, M. R. L. V.; Cortez, L. A. B.; Griffin, W. M.; Scandiffio, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?, **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.

Levasseur, A.; Pagès, S.; Fierobe, H, P.; Navarro, D.; Punt, P.; Belaich, J, P.; Asther, M.; Record, E. Design and Production in *Aspergillus niger* of a Chimeric Protein Associating a Fungal Feruloyl Esterase and a Clostridial Dockerin Domain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p.6984-6991, 2004.

Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Zyl, W. H.; Pretorius, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiology and molecular biology reviews*, v.66, p.506-577, 2002.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American J. Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.

Mathew, S.; Abraham, E. T. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.565-570, 2005.

Medve, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production in synergism of cellobiohydrolases I, II and endoglucanase II. Lund, Sweden. Tese em Doutorado de Bioquímica. Lund University, 1997.

Menezes, C. R.; Durrant, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde. **Ciência rural**, v.30, p. 587-592, 2008.

Moukoulis, M.; Topakas, E.; Christakopoulos, P. Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*. **Microbiol Biotechnol**, v.79, p.245-254, 2008.

Moura, A. P. Características do mercado de etanol no Brasil e nos Estados Unidos: uma análise do desempenho econômico a partir do ambiente institucional. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

Moure A.; Cruz, J. M.; Franco D.; Domínguez, J.M.; Sineiro, J.; Domínguez. H. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v.72, p.145-71, 2001.

Nascimento, R. Cana pode gerar energia de uma Itaipu em 5 anos. 19 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.cl.terra.com/tecnologia/interna/0,,OI2085166-EI8938,00.html>>. Acesso em: 15 de Setembro de 2010.

Ogeda, T. L.; Petri, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa, **Química Nova**, v. 33,

p.1549-1558, 2010.

Oliveira, A. C.; Valentin, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, v. 32, p.689-702, 2009.

Osawa, T.; Namiki, M.; Kawakishi, S. Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. *Basic life sciences*, v.52, p.139-53, 1990.

Ou, S.; Kwok, K-C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. of the Science of Food and Agriculture*, v.84, p.1261-1269, 2004.

Ou, S.; Luo, S.; Xue, F.; Huang, C.; Zhang, N.; Liu, Z. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *J of Food engineering*, v.78, p.1298-1304, 2007.

Pacheco, S. M. V.; Damasio, F. Vanilina: origem, propriedades e produção. *Química Nova na escola*, v.32, p. 215-219, 2010.

Pervaiz, M.; Correa, C. A. Biorefinaria - Desenvolvimento de Plataformas Químicas através de Tecnologias Integradas de Biomassa. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, p.1-11, 2009.

Prade, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.13, p.100-131, 1995.

Rabello, T.; Yoneya, F. Bagaço de cana, resíduo cada vez mais lucrativo. O Estado de São Paulo, São Paulo, 09 set. 2008.

Ramalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006.

Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. Paris: Dunod; 1968.

Rosazza, J. P. N.; Huang, Z.; Dostal, L.; Volm, T.; Rousseau, B. *J. of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.15, p.457-471, 1995.

Rozzell, J. D. Commercial Scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.7. p. 2245-2261, 1999.

Rumbold, K.; Biely, P.; Mastihubova, M.; Gudelj Gubitza, G.; Robra, K.H.; Prior, B. A. Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.5622-5626, 2003.

Saavedra, F.; Karácsonyi, S.; Alfoldi, J. Studies of the polysaccharides of sugar cane (*Saccharum officinarum*): structural features of the water insoluble D-xylans. *Carbohydrate Re*, v.180, p.61-71, 1998.

Said, S.; Pietro, R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 1-7, 2004.

Sandgren, M.; Sahlberg, J.; Mitchinson, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.*, v. 89, p.246-291, 2005.

Scheufele, F. B.; Butzke, A. S.; Marra, I. F.; Hasan, S. D. M.; Fiorese, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Engevista*, v. 14, p. 310-321, 2012.

Shahidi, F.; Naczki, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.

Shin, H-D.; Chen, R. R. A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad

- pH applicability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.73, p.1323-1330, 2007.
- Sies, H.; Stahl, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American J. of Clinical Nutrition*, v.62, p.1315-1321, 1995.
- Siqueira, G.A. Hidrólise enzimática do bagaço de cana deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular. Tese de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.
- Silva, A. M. Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- Silva, V. S.; Garcia, C, A.; Silva, C. M. O destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.3, p. 59-76, 2010.
- Srinivasan, M.; Sudheer, A. R.; Menon, V. P. Ferulic acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, v.40, p. 92-100, 2007.
- Sjöström, E.; Westermark, U. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution. In: Sjöström, E.; Alén, R. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, p.71-81, 2002.
- Squina, F. M.; Mort, A. J.; Decker, S. R.; Prade, R. A. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. *Protein Expression and Purification*, v. 68, p.65-71, 2009.
- Stefano, F. Do bagaço ao megawatt. Revista Exame, São Paulo, Editora Abril S.A., ed. 0922, 10 jul. 2008.
- Tímar-Balázsy, A.; Eastop, D. Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth Heinemann, 1998.
- Topakas, E.; Stamatis, H.; Biely, P.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Christakopoulos, P. Purification and characterization of feruloil esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *J. of Biotechnonology*, v.102, p.33-44, 2003.
- Vidal, M. F.; Santos, J. A. N.; Santos, M. A. Setor sucroalcooleiro no nordeste brasileiro: estruturação da cadeia produtiva, produção e mercado. Fortaleza, CE: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2006.
- Wong, D. S. W. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.133, p.87-112, 2006.
- Wong, K. K. Y.; Tan, L. U. L.; Saddler, J. N. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, v.52, p.305-317, 1988.

CAPÍTULO 2 - Estudos para obtenção de ácido ferúlico a partir do bagaço de cana-de-açúcar utilizando a enzima feruloil esterase de *Aspergillus clavatus*

2.1. Introdução

Neste capítulo estão descritas detalhadamente as estratégias e metodologias utilizadas para o desenvolvimento de uma possível rota biotecnológica envolvendo feruloil esterase para obtenção de ácido ferúlico a partir do bagaço de cana e avaliação da capacidade antioxidante dos produtos liberados da hidrólise, bem como todos os resultados e discussões relativas ao tema.

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido apontado como um resíduo agroindustrial com potencial econômico para produção de produtos com valor agregado, porém, como muitos autores afirmam, este processo não é trivial, existindo muitos obstáculos que o tornam ainda impraticável (Pandey *et al.*, 2000; Ogeda e Petri, 2010). Neste sentido Ou *et al.* (2007) avaliou a possibilidade de produzir ácido ferúlico a partir do bagaço de cana através de hidrólise alcalina, no entanto, a rota biotecnológica envolvendo enzimas específicas, no caso feruloil esterases, garantem ao processo estabilidade, especificidade e reciclagem destas enzimas (Ogeda e Petri, 2010; Wong, 2006). Trabalhos anteriores empregaram feruloil esterases para produzir ácido ferúlico a partir de resíduos agroindustriais (Faulds *et al.*, 1997; Faulds *et al.*, 2002) porém não existem trabalhos publicados empregando o bagaço de cana e feruloil esterases.

As estratégias adotadas iniciaram com a purificação de uma feruloil esterase recombinante derivada do fungo filamentosso *Aspergillus clavatus*, enzima ainda não descrita na literatura, a partir de células *E.coli* BL21. Nesta etapa, as técnicas de separação empregadas foram a cromatografia de afinidade, uma técnica altamente seletiva utilizada para separar proteínas baseada em uma interação reversível entre uma proteína (ou grupo de proteínas) e um ligante específico fixo à matriz cromatográfica e a cromatografia de filtração em gel, técnica que separa moléculas com base nas diferenças de tamanho, por esse motivo, também é denominada de cromatografia por exclusão de tamanho, onde a capacidade de separação da coluna (resolução) está diretamente ligada ao tamanho dos poros que a compõe (Faria *et al.*, 2006). Após a quantificação proteica, na segunda etapa foi avaliada a atividade da feruloil esterase purificada em substratos sintéticos específicos, empregando as técnicas de espectrofotometria de varredura e Eletroforese Capilar de Zona (CZE). A CZE constitui uma técnica moderna de separação, com ampla aceitação no âmbito acadêmico e industrial. Apesar da excelência do seu desempenho

analítico, da diversidade de suas aplicações e relativamente baixo custo instrumental, no Brasil, esta técnica é ainda pouco difundida (Tavares, 1997). Na CZE, a separação ocorre devido à migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, a qual é função da razão carga e tamanho do íon e da presença do fluxo eletroosmótico (EOF) para um dado pH. As vantagens de utilização desta técnica são: rápida capacidade de separação, tempo de análise relativamente curto, facilidade de operação e automação, alto poder de resolução, injeção de pequeno volume de amostra (nanolitros) e exposição mínima do analista a substâncias químicas tóxicas (Tavares, 1997).

Na terceira etapa, foi avaliada a capacidade da feruloil esterase em hidrolisar e liberar ácido ferúlico e outros compostos fenólicos de arabinosilano de trigo e bagaço de cana *in natura* e também neste mesmo bagaço tratado com ácido acético e peróxido de hidrogênio, quantificação dos compostos fenólicos liberados e avaliação de suas capacidades antioxidantes.

Por fim, também foram realizados ensaios enzimáticos empregando substratos sintéticos para caracterização da FAE de *A.clavatus*, bem como a construção de uma árvore filogenética utilizando sequências de aminoácidos de diferentes feruloil esterases previamente caracterizadas. Estes estudos visaram a classificação desta feruloil esterase entre os grupos A, B, C ou D, como proposto por Crepin *et al.* (2004).

2.2. Material e métodos

2.2.1. Expressão e purificação de uma feruloil esterase de *Aspergillus clavatus*

No presente estudo, foi utilizada uma feruloil esterase de *A.clavatus* expressa em *E.coli* BL21, desenvolvida no projeto de iniciação científica do aluno Cleiton Márcio Pinto juntamente com o pesquisador Dr. Fabio Squina no ano de 2010 no CTBE - Laboratório de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (Campinas).

Para produzir a enzima, células de *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformadas com o gene relativo a FAE de *A.clavatus*, clonado no vetor de expressão pET28a (Figura 11), foram cultivadas em 800 mL de meio LB (0,1% triptona; 0,5% extrato de levedura, 0,1% NaCl) com 50 µg/mL de antibiótico kanamicina, a 37°C sob 200 rpm de agitação até atingir OD₆₀₀ de 0,6. A expressão foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 0,5 mM. Após 4 horas, as células foram centrifugadas a 8.000 x g, durante 25 minutos a 4°C.

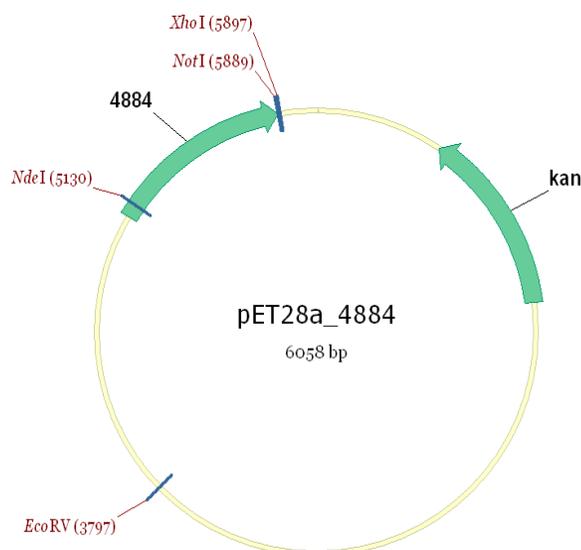


Figura 11. Mapa do vetor pET28a contendo a sequência nucleotídica XM_001274883.1 (National Center for Biotechnology Information) referente a feruloil esterase. Em destaque: os sítios das enzimas de restrição; região a ser expressa para síntese da proteína de interesse; e sequência responsável pela resistência à kanamicina (kan). O vetor pET-28a possibilita um alto nível de expressão do gene clonado, em razão de possuir um promotor forte, o promotor do fago T7. Permite também que a proteína sintetizada apresente um *His-Tag* (sequência de seis resíduos de histidina) em sua porção amino-terminal, facilitando sua purificação nas etapas subsequentes.

O pellet obtido foi ressuspensão em 13 mL de uma solução tampão contendo 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 25% sacarose, 1 mM NaEDTA, 10 mM DTT. Logo depois foi adicionado à suspensão 2 mM de inibidor de protease PMSF, a qual foi submetida a trinta ciclos de ultra-som em um sonificador de ponteira (Labometric LB-750), sendo cada ciclo composto por um pulso de cinco segundos a 40% de amplitude e pausa de dez segundos. Após esta etapa, foram adicionados 0,3 mg/mL de lisozima, 0,02 mg/mL de DNase I (Invitrogen) e 2 mM de MgCl₂. A mistura foi agitada, e então foi adicionado 12,5 mL de uma solução tampão de lise contendo 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 1% Triton Xdu-100; 1% deoxicolato de sódio; 100 mM NaCl; 10 mM DTT, e homogeneizada novamente.

A suspensão foi incubada à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após este período, adicionou-se 350 µL de NaEDTA pH 8,0 (0,5 M NaEDTA; 50 mM Tris-Cl pH 8,0) e realizou-se o congelamento rápido em nitrogênio líquido. A solução foi descongelada em banho a 37°C por 30 minutos. Então, foi adicionado 200 µL de MgCl₂ (0,5 M). Após 60 minutos à temperatura ambiente, para que a viscosidade da solução diminuísse, foi adicionado 350 µL de EDTA.

A suspensão foi então centrifugada a 11.000 g durante 20 minutos a 4°C. O pellet resultante depois de ressuspensão em 10 mL de uma solução tampão de lavagem contendo 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM NaEDTA, 0,02% azida de sódio, 10 mM DTT, foi submetido ao sonicador, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Efetuou-se uma nova centrifugação, e o pellet obtido novamente foi ressuspensão em 10 mL de uma solução tampão contendo 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 100 mM NaCl. Após uma última centrifugação, o pellet foi dissolvido em 9 mL de solução de guanidina pH 8,0 (6 M de guanidina-HCl; 50 mM de Tris-Cl pH 8,0), sendo mantido sobre o gelo. Por fim, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos, sendo logo em seguida submetida à cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), usando Ni²⁺ como metal de afinidade.

No presente trabalho, a proteína recombinante FAE utilizada, foi fusionada a uma cauda de histidina (*his-tag*) no N-terminal, permitindo sua interação com um meio contendo íons de níquel, onde posteriormente é eluída através de um gradiente de imidazol, o qual funciona como um competidor pelo níquel presente na coluna.

Primeiramente, a coluna de Sepharose (HiTrap Chelating HP 5 mL, GE Healthcare[®]) carregada com íons de níquel foi equilibrada com tampão de lavagem pH 8,0 (6M de uréia; 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 300 mM NaCl; 5 mM de imidazol).

Após o equilíbrio, amostra foi aplicada na coluna, utilizando o sistema automatizado AKTA Purifier (GE Healthcare[®]) e a coluna então foi lavada com o tampão supracitado para remoção de proteínas não específicas. Em seguida, foi dado início à fase de eluição (gradiente linear), empregando-se o tampão de eluição em pH 8,0 contendo 6M de uréia, 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 300 mM NaCl e 500 mM de imidazol e fluxo de 1 mL/min. As amostras eluídas foram monitoradas a 280 nm e coletadas em frações de 1,5 mL mantidas no gelo.

As frações referentes à proteína de interesse foram agrupadas (aproximadamente 7 mL) e inseridas em membrana para diálise para ser então dialisada a 4°C *overnight* contra 1,8 L de tampão pH 8,0 (6M de uréia; 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 300 mM NaCl) para remoção do imidazol.

A amostra dialisada foi incubada sobre o gelo com 10 mM de β-mercaptoetanol por uma hora, com o objetivo de dificultar a formação de pontes de dissulfeto mantendo a estrutura peptídica estabilizada, evitando a precipitação da proteína.

A etapa de *refolding* (renaturação) foi realizada empregando o método de diluição gota a

gota em tampão sob lenta e constante agitação. A amostra (7,5 mL) foi gotejada, empregando-se um intervalo de vinte minutos (a cada 1 mL) em 500 mL de tampão pH 9,0 (50mM CHES; 10 mM β -mercaptoetanol; 10% glicerol) previamente refrigerado e mantido a 4°C, onde permaneceu sob agitação *overnight* a 4°C.

Após a etapa de *refolding* foi necessário concentrar a proteína utilizando uma célula de agitação (Amicon) com uma membrana de polietersulfona como poro nominal de 5kDa e pressão máxima 20 psi. O sistema de ultrafiltração permitiu a concentração da amostra até aproximadamente 30 mL. Posteriormente, o material restante foi concentrado através de um Centricon com poro nominal de 10 kDa obtendo-se 3 mL de amostra.

Com o objetivo de separar frações de FAE corretamente enoveladas de agregados de proteínas ainda presentes no concentrado, a amostra foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel.

Nesta etapa, 500 μ L de amostra foram aplicados em uma coluna Superdex 200 GL 10/300 (10 mm de diâmetro e 300 mm de altura) (GE Healthcare[®]) empregando-se um tampão de eluição a pH 9,0 contendo 10 mM CHES, 50 mM NaCl e 5% glicerol. O sistema AKTA Purifier (GE Heathcare[®]) foi empregado para automação do processo.

As amostras eluídas foram coletadas e fracionadas (sob o gelo) conforme monitoramento da absorvância a 280 nm. Foram realizadas sucessivas aplicações até o consumo de amostra concentrada. As frações referentes à FAE foram agrupadas e a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford e relatada como ng/ μ L. O fluxograma do processo de obtenção da FAE é mostrado na figura 12.

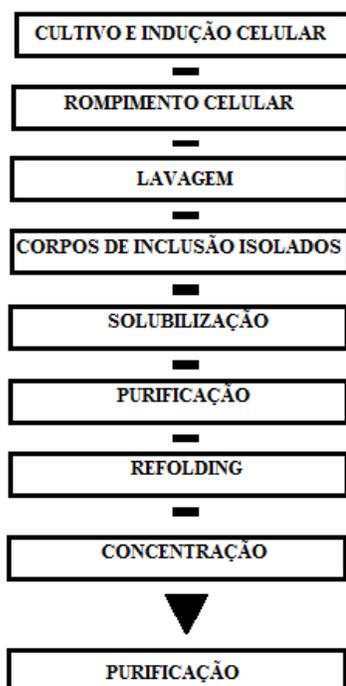


Figura 12. Fluxograma do processo empregado para obtenção de feruloil esterase bioativa a partir de corpos de inclusão.

2.2.2. Ensaios enzimáticos empregando substratos sintéticos para caracterização da FAE de *A.clavatus*

Para uma maior compreensão do modo de ação da FAE de *A.clavatus* sobre a biomassa, foram realizados ensaios enzimáticos utilizando substratos sintéticos. O objetivo dos ensaios foi classificar a FAE em tipo A, B, C ou D, baseada na similaridade da atividade de esterase em substratos sintéticos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e na similaridade de suas sequências de aminoácidos com outras FAEs já descritas na literatura, conforme proposto por Crepin *et al.* (2004).

Os substratos sintéticos utilizados nos ensaios foram metil ferulato, metil *p*-cumarato e metil cafeato, previamente preparados em solução, utilizando metanol como solvente.

Primeiramente foram calculados os valores de coeficiente de extinção molar real de cada ácido produzido nas três reações (ácido ferúlico, *p*-cumárico e cafeico) utilizando espectrofotômetro de varredura (Tecan[®] – Infinite M200) e cubeta de quartzo com 1 cm de comprimento. Foram preparadas soluções na concentração de 4.10^{-5} M dos três ácidos,

dissolvendo-os primeiramente em metanol e depois em tampão SAB pH 6.0 (50 mM). Os valores de absorvância utilizados na Lei de Lambert Beer foram referentes ao comprimento de onda (nm) de maior absorção para cada ácido.

As reações enzimáticas contendo uma concentração final de 10 mM de substrato e 1,75 mM de FAE em tampão SAB pH 6,0 (50 mM) foram incubadas a 40°C durante 60 minutos. As reações foram lidas nas mesmas condições anteriormente descritas. A concentração de ácido ferúlico, *p*-cumárico e cafeico produzido em cada reação foi calculada através da Lei de Lambert Beer utilizando o coeficiente de extinção molar real. Os testes foram realizados em triplicata e para cada substrato foi realizado um controle negativo, onde foi adicionada a enzima inativa.

A reação enzimática utilizando metil ferulato foi também monitorada pela técnica de CZE, com o intuito de observar a formação do ácido ferúlico ao longo do tempo.

Na primeira etapa da análise, foram determinadas as condições de operação do equipamento P/ACE MDQ (Beckman Coulter® - Indianapolis, IN, USA) apropriadas e o tampão de corrida correto. Depois de certificado que as condições fixadas estavam apropriadas para a análise (utilizando metil ferulato e ácido ferúlico padrão), foi realizado um ensaio enzimático com o substrato metil ferulato, nas mesmas condições descritas e incubadas por 30 e 60 minutos a 40°C. A reação foi diluída 10 vezes em metanol e injetada no equipamento. Os parâmetros adotados foram: tempo de injeção de 5 segundos, voltagem fixa de 18 kV, tempo de corrida de 10 minutos, filtro de UV de 280 nm e temperatura de 20°C. O capilar (coluna) empregado foi o de sílica fundida (TSP050375, Polymicro Technologies - Phoenix, AZ, USA) com o diâmetro interno de 50 µm e 50 cm de comprimento. O tampão escolhido foi borato de sódio pH 8.3 (100 mM).

Foram também realizados testes de atividade da FAE nos substratos sintéticos α -naftil butirato (NB) e α -naftil acetato (NA) como descrito anteriormente (Koseki *et al.*, 2007) com algumas modificações. Primeiramente foi construída uma curva padrão do produto liberado, o α -naftol, em concentrações que variaram de 0,05 a 0,3 µmol/mL no espectrofotômetro de varredura (Tecan® – Infinite M200) utilizando microplacas de 96 poços e comprimento de onda de 560 nm. As reações foram preparadas da seguinte forma: 35 µL de tampão SAB pH 6,0 (0,1 M), 10 µL de NA ou NB 50 mM (dissolvidos em DMSO) e 5 µL da fonte de enzima pura (200 ng/µL). As reações foram homogeneizadas e incubadas a 40°C durante 15 minutos. Após o período de

incubação, foram adicionados 50 µL do reagente Fast Garnet GBC (0,1% FG; 15% de dodecil sulfato de sódio) da marca Sigma. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por mais quinze minutos e então lida nas mesmas condições descritas. As reações foram conduzidas em triplicata e foi definido como uma unidade de atividade (U) a quantidade de α -naftol liberado (μmol) por minuto, por mg de FAE nas condições de reação descritas.

2.2.3. Ensaio enzimático para avaliação da capacidade da FAE de *A.clavatus* na liberação de compostos fenólicos a partir da biomassa

A capacidade da feruloil esterase em liberar ácido ferúlico de substratos naturais foi avaliada sobre o arabinoxilano de trigo (Megazyme) insolúvel contendo em sua composição de açúcares 36% de arabinose, 51% de xilose, 6.5% de glicose, 4.4.% de manose e 1.6% de galactose. Com aproximadamente 80% de pureza, este polímero natural é cuidadosamente extraído e purificado de sua fonte a fim de manter intactas as ligações cruzadas entre os arabinoxilanos e o ácido ferúlico, o que justifica a escolha deste substrato (informações fornecidas pelo fabricante).

A reação enzimática contendo 60 µL de arabinoxilano de trigo 1% (p/v) em tampão SAB pH 6,0 50 mM com 40 µL de enzima (200 ng/µL) e a reação controle (sem enzima) foram incubadas a 40°C e 500 rpm de agitação (Thermomixer Comfort) durante 60 minutos e posteriormente analisadas por CZE nas mesmas condições descritas no item 2.2.2.

A capacidade da enzima em liberar ácido ferúlico do bagaço de cana-de-açúcar também foi avaliada e monitorada por CZE.

O bagaço de cana empregado foi gentilmente cedido pelo pesquisador Carlos Eduardo Driemeier do CTBE e foi adquirido da Usina São José. Resumidamente, o tratamento físico consistiu em Fracionamento por peneira a seco (malhas de 4.0 a 0 mm) seguido de Moagem por facas (malha de 1.0 mm) e finalmente moagem por Impacto e Cisalhamento (malha de 0.08 mm).

Para tanto, 10 mg de bagaço de cana *in natura* moído foram incubados com 40 µL de enzima purificada (220 ng/µL) e 160 µL de tampão SAB pH 6.0 (50 mM) a 40°C, 900 rpm de agitação (Thermomixer Comfort - Eppendorf) durante 60 minutos. A agitação da reação foi vigorosa a fim de garantir a homogeneidade da solução, evitando que o bagaço sedimentasse no fundo do tubo eppendorf.

2.2.4. Ensaio enzimático para avaliação da capacidade da FAE de *A.clavatus* na liberação de compostos fenólicos de bagaço de cana pré-tratado quimicamente

Como o objetivo de avaliar se um pré-tratamento químico no bagaço de cana aumentaria a digestibilidade enzimática (aumentando a extração dos compostos fenólicos), foram realizados testes no qual o bagaço de cana foi tratado com uma mistura de ácido acético e peróxido de hidrogênio. Essa mistura, empregada no tratamento de polpas celulósicas, é um forte agente oxidante que apresenta bons índices de deslignificação e baixos índices de degradação da celulose, além de permitir a obtenção de alvuras elevadas, resultando no branqueamento das polpas celulósicas (Brasileiro *et al.*, 2001).

A metodologia adotada para o pré-tratamento foi adaptada da metodologia desenvolvida por Franklin (1937) para a dissociação dos elementos celulares da madeira. Inicialmente, foi pesado com auxílio de balança analítica aproximadamente 10 mg de bagaço *in natura* (procedência descrita no item 2.2.3) em tubos tipo *eppendorf* de 0,5 mL e adicionou-se 1 mL de solução peracética [1 ácido acético: 1 peróxido de hidrogênio (v/v) – recém preparada]. A mistura foi incubada a 60°C e 1000 rpm de agitação (Thermomixer Comfort) durante 15, 45, 60, 120 e 180 minutos. Após os tempos estipulados, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min e o sobrenadante (S1) foi separado da biomassa.

A biomassa resultante (*pellet*) do tratamento químico foi lavada seis vezes com água MilliQ e três vezes com tampão SAB pH 6,0 (50 mM). Foi então adicionado 80µL da enzima feruloil esterase pura (0.22 mg/mL) e o volume da reação foi ajustado para 500µL com o mesmo tampão de lavagem. Após mistura ser incubada por um período de 3 horas a 950 rpm e 37°C (Thermomixer Comfort), foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min e o sobrenadante (S2) foi separado da biomassa novamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

De acordo com Deschamps e Ramos (2002) os ácidos fenólicos majoritários do bagaço são o ácido ferúlico e *p*-cumárico. Desta forma, foi construída uma curva de calibração com os padrões destes ácidos (Sigma®) utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND – 1.000 (Thermo) a 310 nm (comprimento de onda referente a absorvância dos dois compostos) para a determinação da quantidade dos fenólicos totais presente no sobrenadante (S2).

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$) de significância para comparação das médias dos diferentes tempos de tratamento, utilizando o programa Statistica 8.0 (StatSoft).

2.2.5. Ensaio para a quantificação dos compostos fenólicos liberados da biomassa lignocelulósica via tratamento enzimático e determinação de suas capacidades antioxidantes

As reações enzimáticas foram preparadas com 2% (p/v) do substrato arabinosilano de trigo (Megazyme) ou bagaço de cana pré- tratado (como descrito no item 2.2.4 por um período de 7 horas) e FAE a uma concentração final de 0,08 mg / mL. A reação foi conduzida a 37 °C, agitação de 1400 rpm durante 5 horas. Para cada substrato, reações utilizando FAE inativa (76 °C por 10 min) foram realizadas como controle.

O total de conteúdo de compostos fenólicos dos sobrenadantes foi determinado usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) adaptado para microplacas utilizando ácido gálico como padrão de referência.

Em cada poço da placa foi adicionado 150 µL de água ultra pura (Milli Q), 25µL do sobrenadante da reação em 4 diluições diferentes e 25 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi incubada no leitor de microplacas, sendo primeiramente agitada durante 20 segundos e depois incubada a 25°C durante 5 minutos. Então foi adicionado 100 µL de carbonato de sódio 7%. O sinal de absorvância foi medida após 2 horas, a 765 nm em leitor de microplacas (Synergy Mx, Biotek, USA). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por L de extrato.

A capacidade de desativação do radical peroxila foi medida pelo monitoramento do decaimento da fluorescência, devido à oxidação de fluoresceína de acordo com o método ORAC (The Oxygen Radical Absorbance Capacity), com algumas modificações (Ou *et al.*, 2001).

O radical ROO[•] foi gerado pela termodecomposição de dicloridrato de 2,2'-diazó(2-amidinopropano) (AAPH). A reação (feita em microplacas) continha os seguintes reagentes e as concentrações (em um volume final de 200 µL): fluoresceína (61 nM), extratos enzimáticos em 75 mM de tampão de fosfato pH 7,4 e AAPH (19 mM). A solução trabalho de fluoresceína foi diluída 5000 vezes em tampão de fosfato 75 mM pH 7,4 a partir de uma solução mãe de 1,53 mg/mL, previamente preparada e estocada a 4 °C. A mistura foi incubada em microplacas a 37 °C durante 10 min em leitor de microplacas Synergy Mx (Biotek[®],USA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

O sinal de fluorescência foi monitorado a cada minuto no comprimento de onda de emissão de 528 ± 20 nm com excitação a 485 ± 20 nm até um decaimento de 95% da

fluorescência inicial. O tampão fosfato 75 mM foi usado como branco (controle negativo) e diferentes concentrações de Trolox foram utilizadas como amostra de referência.

Os resultados foram expressos em mmol equivalente a Trolox (TE)/ L de extrato, calculados de acordo com a Ou *et al.* (2001). Resumidamente, a capacidade antioxidante dos extratos e do padrão foi calculada com base na diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC_{extrato}) e na sua ausência (AUC_{branco}). Equações de regressão entre net AUC e a concentração da amostra foram calculados para todos os extratos e Trolox.

2.2.6. Construção de uma árvore filogenética utilizando sequências de aminoácidos de diferentes tipos FAEs

Para classificar a FAE em estudo (em tipo A, B, C ou D) foram adotados os seguintes critérios: (1) análise da similaridade da atividade de esterase em substratos sintéticos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos com outras FAEs estudadas anteriormente (Faulds *et al.*, 1994; Kroon *et al.*, 2000; Topakas *et al.*, 2003) e (2) análise da similaridade da sua sequência de aminoácidos com as sequências de FAEs já classificadas anteriormente (nestes mesmos grupos) através da construção de uma árvore filogenética.

As árvores filogenéticas expressam a similaridade, ancestralidade e relacionamentos entre as espécies ou grupo de espécies e auxiliam a explicar os possíveis relacionamentos entre as espécies atuais e a deduzir as histórias evolutivas das mesmas. Possuem folhas que representam as espécies (táxons) e nós internos que correspondem aos seus ancestrais hipotéticos de tal forma que espécies mais próximas tenham nós correspondentes mais próximos na árvore. A partir de informações catalogadas em grandes bases, é possível inferir filogenias utilizando-se de dados, como distâncias e características, relativos aos genes de cada espécie. As características correspondem aos atributos que possuem cada táxon (denominação dada a uma espécie ou a um grupo de espécies), sendo possível obter as relações entre eles com base na similaridade destes atributos (Andreatta e Ribeiro, 2002). Para a análise filogenética, foram utilizadas as sequências de aminoácidos disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) de 13 FAEs previamente descritas bioquimicamente. Estas sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW para a construção de uma árvore filogenética utilizando-se o software MEGA agrupando-se pelo método *neighbor-joining* utilizando p-distance para nucleotídeos com

a opção de *pairwise gap deletion* e *bootstrap* com 1000 e 10000 repetições para a determinação da distancia genética entre as sequencias utilizadas.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Ensaio enzimáticos empregando substratos sintéticos e classificação da FAE em estudo

Após as etapas de expressão e purificação da FAE, foi realizado um teste de atividade empregando os substratos NB e NA com o objetivo de verificar se a enzima estava ativa para proceder com os posteriores ensaios. A partir de uma curva padrão construída do produto liberado (Figura 13), o α -naftol, foi calculada a atividade, que foi de $62,2 \pm 0,3$ U para o substrato NA e $14,0 \pm 0,3$ U para o NB.

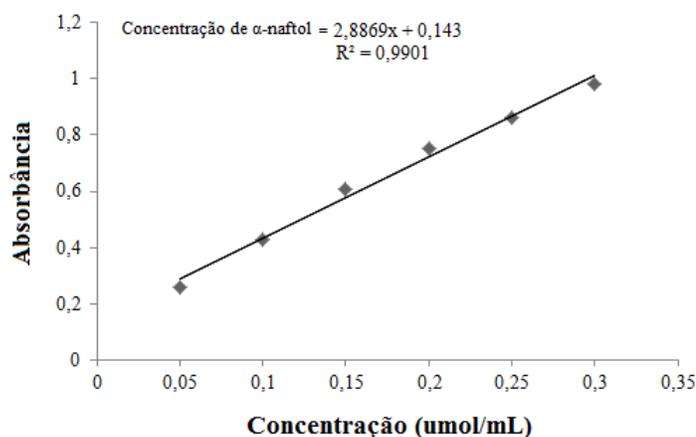


Figura 13: Curva de calibração utilizada para determinação da concentração de α -naftol liberado nas reações enzimáticas utilizando α -naftil-butirato e α -naftil-acetato como substratos.

Baseado na análise da similaridade da atividade de esterase em substratos sintéticos metilados (Figura 14) e na sequência de aminoácidos de FAEs já estudadas e classificadas anteriormente, a FAE de *A.clavatus* foi classificada como tipo D (Figura 15).

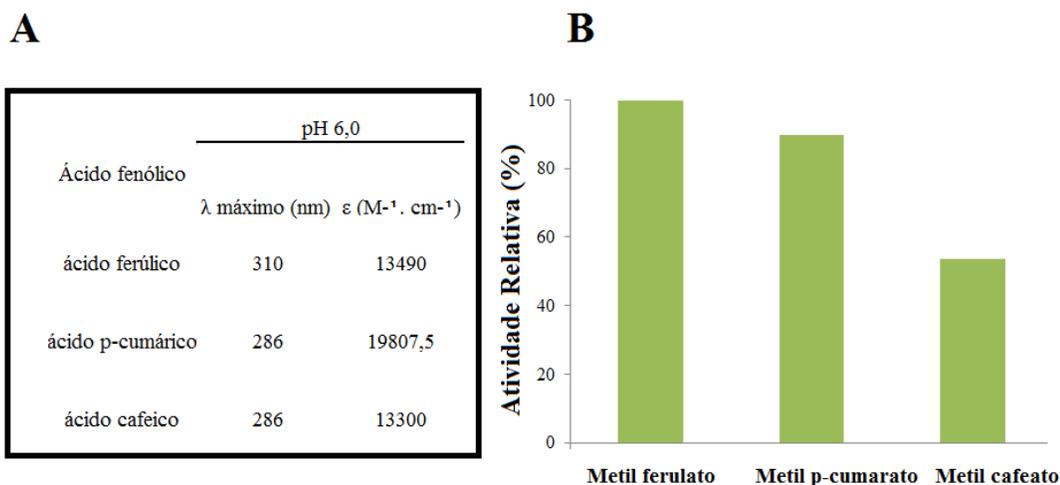


Figura 14: (A) Valores dos coeficientes de extinção molar real para cada ácido fenólico em pH 6,0 (B) Atividade Relativa (%) da FAE de *A.clavatus* sobre os substratos sintéticos. Os valores de atividade foram 108 (100%), 97 e 58 U para metil ferulato, metil *p*-cumarato e metil cafeato, respectivamente, sendo U definido como a quantidade de cada ácido liberado (μ mol) por minuto, por mg de FAE, nas condições de reação anteriormente descritas.

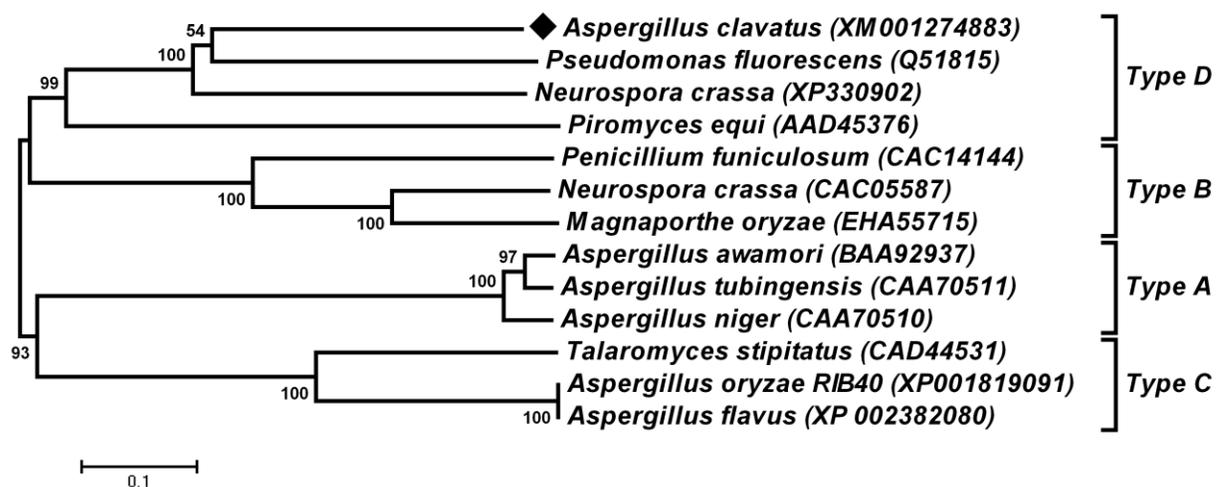


Figura 15: Análise filogenética dos genes de FAEs. Os alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos de 13 FAEs foram realizadas usando ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw). A árvore filogenética foi construída a partir destes alinhamentos usando o método *neighbor-joining* e o software MEGA (www.megasoftware.net). O número nos nós representa a porcentagem de valores de *bootstrap* (1000 repetições). A barra de escala representa a distância filogenética de 0,1 substituições de aminoácidos por site. O número de acesso NCBI das proteínas é indicado.

A análise filogenética evidenciou que a sequência de aminoácidos da FAE de *A.clavatus* apresenta similaridade com as sequências de FAEs do tipo D. A FAE da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (XYLD) foi a primeira esterase a ser classificada como este tipo. Esta classe inclui também EstA do fungo *Piromyces equi* e Esterase D da bactéria *Cellvibrio japonicus* (Wong, 2006).

Esterases do tipo D agem sobre todos os ésteres metílicos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (metil *p*-cumarato, metil ferulato, metil cafeato e metil sinapato) e apresentam similaridade com sequências de xilanases (Fazary e Ju, 2007). Em substratos naturais, possuem a capacidade de liberar um dos inúmeros dímeros de ácido ferúlico, o 5-5'DiFA [ácido (E,E)-4,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-3,3'-bicinâmico] (Figura 16) o qual ocorre principalmente nas gramíneas, ao contrário das FAEs tipos B e C não liberam nenhum dímero (Wong, 2006; Buanafina, 2009).

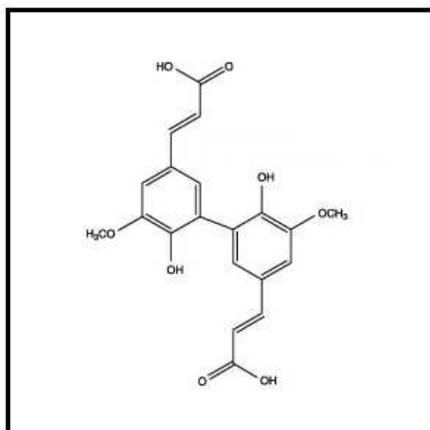


Figura 16: Estrutura do dímero de AF: o ácido (E, E)-4,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-3,3'-bicinâmico (Kroon *et al.*, 1999).

Foi reportado que a esterase XYLD de *Pseudomonas fluorescens* liberou apenas 5-5'DiFA a partir de farelo de trigo e grão de cevada, além de monômeros de ácido ferúlico, evidenciando a especificidade de hidrólise desta classe (Bartolomé *et al.*, 1997).

Empregando a técnica de CZE, foi possível monitorar a reação de hidrólise da FAE sobre o substrato sintético metil ferulato e observar o produto formado, o ácido ferúlico, ao longo do tempo 0, 30 e 60 min (Figura 17). No tempo de 30 min de reação já é possível observar o pico referente ao ácido ferúlico, que teve o tempo de migração (T_m) de 5,74 min nesta corrida. A

técnica empregada se mostrou bastante eficiente, rápida e acurada para realizar este tipo de *screening*. Sterbova *et al.* (2006) em estudos anteriores comprovaram a sensibilidade e seletividade da técnica ao determinar 14 compostos fenólicos, dentre eles o ácido ferúlico, de extratos da gramínea *Bromus inermis L.* em corridas com duração de apenas 10 minutos.

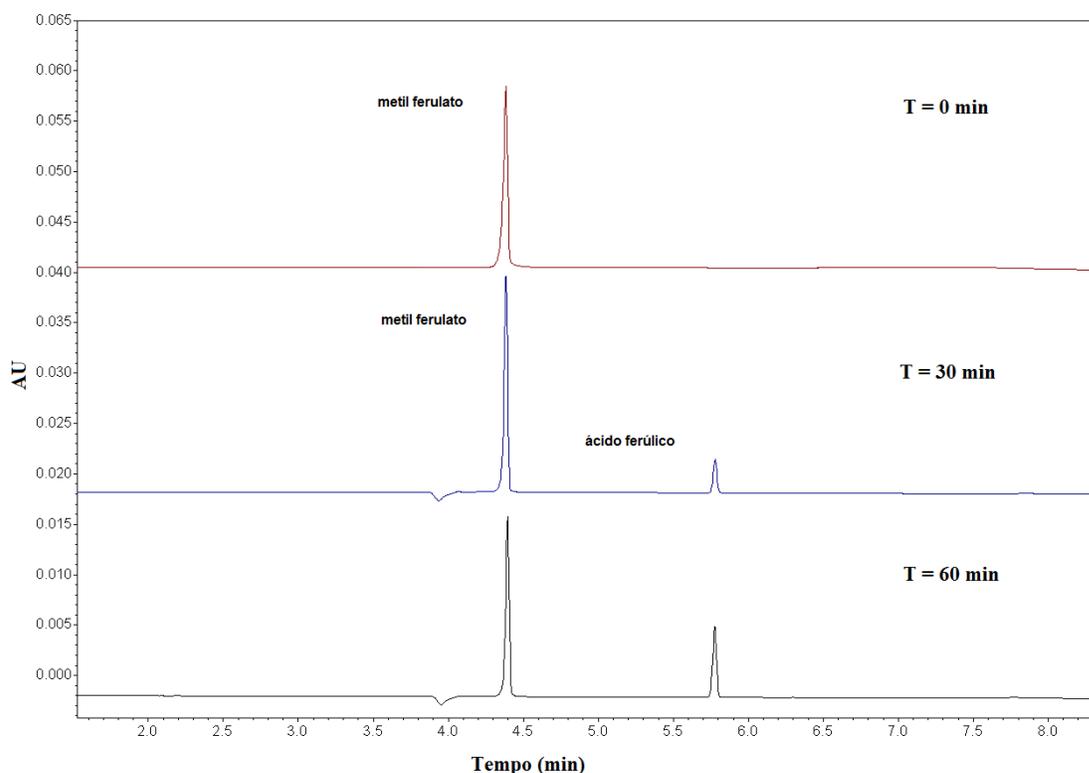


Figura 17: Eletroferograma referentes aos tempos de reação 0, 30 e 60 minutos empregando o substrato metil ferulato obtido pela técnica CZE. O produto da hidrólise da FAE, o ácido ferúlico, é indicado na figura. O eixo abcissa corresponde à absorvância (AU) o eixo ordenado ao tempo (min) da corrida. As condições experimentais estão descritas no texto.

2.3.2. Avaliação da capacidade da FAE de *A.clavatus* na liberação de compostos fenólicos a partir de substratos naturais

A capacidade da FAE em liberar compostos fenólicos de substratos naturais foi avaliada sobre o arabinosilano de trigo (Megazyme) através da técnica de CZE. No eletroferograma referente ao sobrenadante da reação enzimática foi possível observar que houve liberação de um composto com T_m de 5,45 min que estava esterificado à cadeia polimérica. Através de comparação com padrões, foi possível identificar que o produto da hidrólise foi o monômero do

ácido ferúlico (Figura 18).

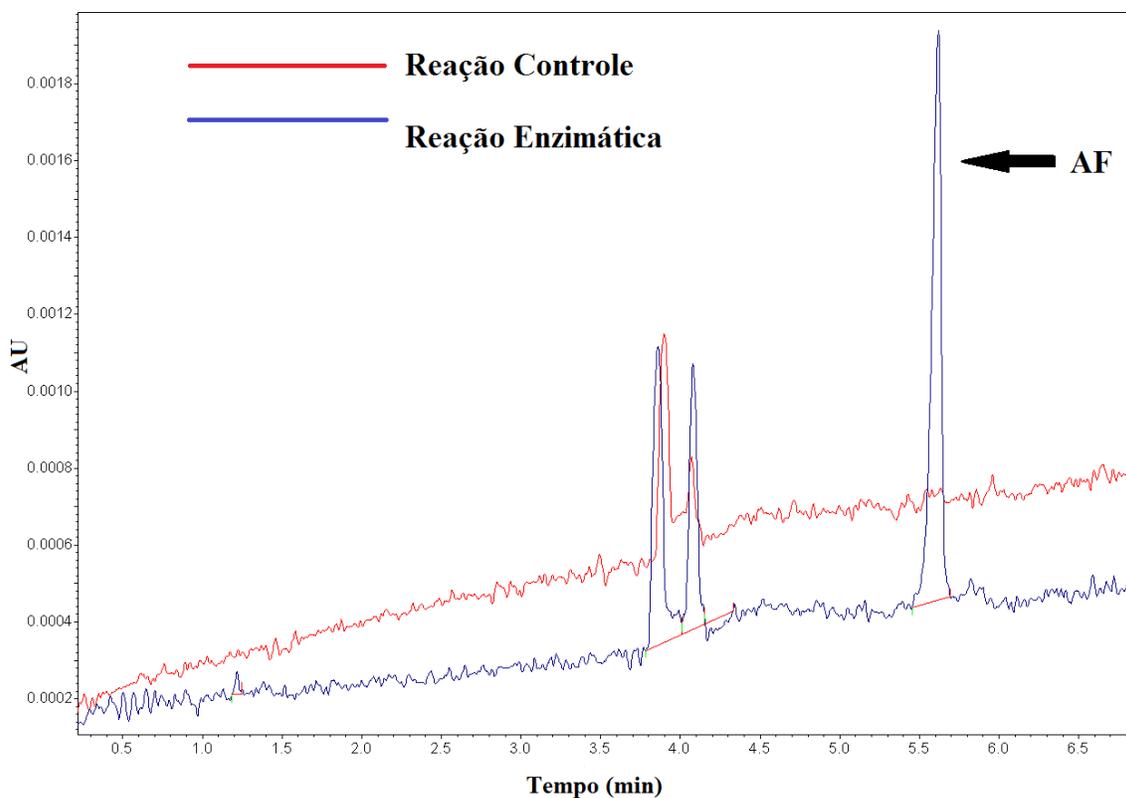


Figura 18: Eletroferograma referente à reação controle (enzima inativa) e enzimática empregando arabinosilano de trigo 1% (p/v). É possível observar que a hidrólise da FAE liberou ácido ferúlico livre (pico indicado na figura). O eixo abcissa corresponde à absorvância (AU) e o eixo ordenado ao tempo (min) da corrida. As condições experimentais estão descritas no texto.

A capacidade da enzima em liberar ácido ferúlico do bagaço da cana-de-açúcar, também foi avaliada por CZE. Através das comparações dos eletroferogramas obtidos das análises do sobrenadante da reação controle e da reação enzimática, foi possível observar que houve a liberação de monômero de ácido ferúlico (Figura 19) através da co-eluição com o ácido ferúlico padrão, porém é necessário que a identidade do ácido seja confirmada por análise de espectrometria de massas porque o pico detectado não foi intenso.

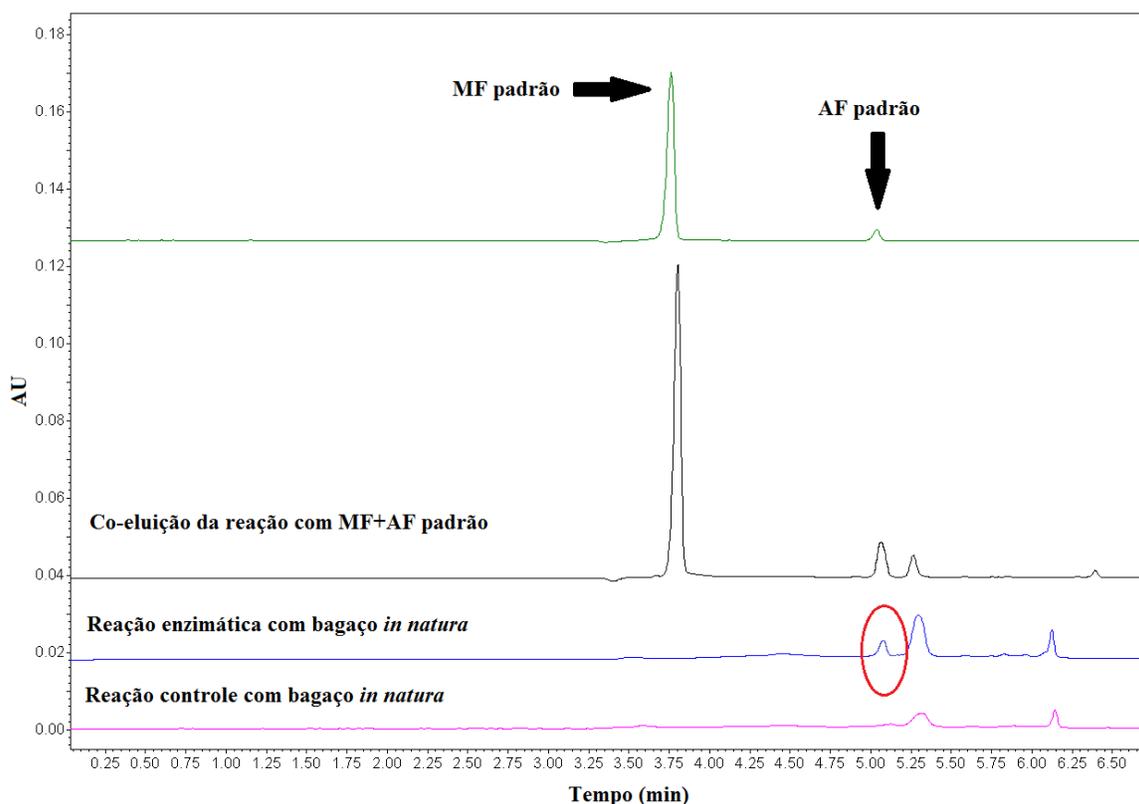


Figura 19: Eletroferograma referente ao metil ferulato e ácido ferúlico padrão, a reação controle e a reação enzimática empregando o bagaço de cana *in natura* e a co-eluição dos mesmos padrões com a reação enzimática, analisados por CZE. Em destaque o pico de ácido ferúlico, produto liberado da hidrólise da FAE. O eixo abcissa corresponde à absorvância (AU) e o eixo ordenado ao tempo (min) da corrida. As condições experimentais estão descritas no texto.

2.3.3. Avaliação da capacidade da FAE de *A.clavatus* na liberação de compostos fenólicos de bagaço de cana pré-tratado quimicamente

A mistura peracética (ácido acético e peróxido de hidrogênio), empregado no tratamento químico do bagaço de cana é considerada um agente deslignificante altamente seletivo, devido à sua capacidade de oxidar estruturas ricas em elétrons, como os anéis aromáticos da lignina (Johnson, 1980) e aumentar a área de superfície de exposição das fibras de hemicelulose.

O objetivo deste tratamento foi avaliar se o pré-tratamento químico no bagaço de cana melhoraria a hidrólise enzimática. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 20.

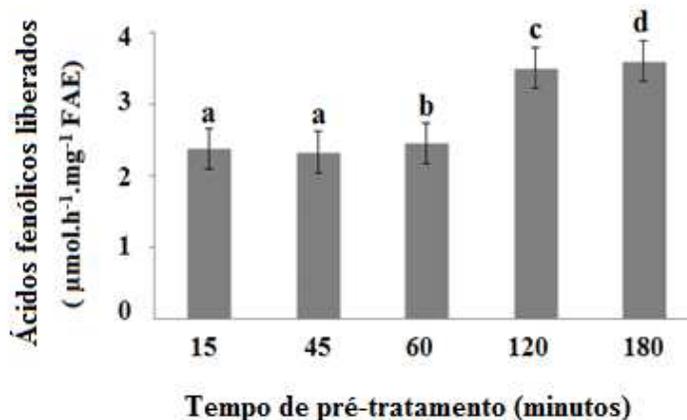


Figura 20: Influência do pré-tratamento químico no bagaço de cana sobre a atividade da FAE de *A. clavatus*. O eixo abcissa corresponde ao tempo, em minutos, de pré-tratamento químico do bagaço *in natura* com ácido acético e peróxido de hidrogênio (1:1) e o eixo ordenada corresponde a quantidade de ácido *p*-cumárico e ferúlico liberados em µmol / tempo de reação (horas) / mg FAE. Letras iguais significa que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância entre os tempos estudados.

De fato, sugerimos que o tratamento químico aumentou a área de superfície e exposição das fibras de hemicelulose, o que facilitou o acesso da feruloil esterase aos sítios de ligação específicos.

Pode-se inferir que o bagaço proveniente do tratamento de 45 min não apresentou maior modificação estrutural (exposição das fibras de hemicelulose) do que bagaço proveniente do tratamento de 15 min, uma vez que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas quantidades de ácidos fenólicos liberados após as reações enzimáticas. Já os tempos de 120 e 180 minutos de tratamento foram os mais eficientes, liberando após as reações enzimáticas a quantidade de $3,51 \pm 0,021$ e $3,61 \pm 0,025$ µmol de ácidos fenólicos. h^{-1} . mg^{-1} de FAE, respectivamente, o que corresponde entre 0,65% a 0,69% da composição total do material.

No processo de produção do bioetanol, o pré-tratamento químico sobre a biomassa tem como objetivo facilitar a hidrólise enzimática nas etapas subsequentes. É ela quem define a extensão, os custos e a eficiência da bioconversão, além de ser criteriosamente escolhida para ser compatível com o processo (Martins *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados neste estudo podem ser uteis na escolha do tempo de pré-

tratamento químico mais eficiente para ser aplicado sobre o bagaço a fim de melhorar a hidrólise enzimática de feruloil esterases, uma vez que o aumento de escala visa processos industriais com variáveis otimizadas.

Em escala laboratorial, Faulds *et al.*, (1997) empregando uma FAE-III de *Aspergillus niger* produziu 1,11 mmol (5,7 g) de ácido ferúlico livre a partir de 1 kg de farelo de trigo pré-tratado enzimaticamente com uma xilanase de *Trichoderma*, o que correspondeu a 57% do total de ácido ferúlico obtido via extração alcalina. Neste estudo, o pré-tratamento teve como objetivo a hidrólise do farelo de trigo em oligossacarídeos ferulilados, facilitando o ataque hidrolítico da feruloil esterase.

A interligação do monômero de ácido ferúlico e diferúlico com a arabinose e a lignina é considerada, por alguns autores, como um fator que contribui para a recalcitrância da parede celular das gramíneas e impede a sua quebra por micro-organismos (Jung e Allen 1995; Buanafina 2009). Em face disto, Anderson e Akin (2008) propõe o pré-tratamento da biomassa proveniente do processamento de espécies diferentes de gramíneas com feruloil esterases como uma estratégia biológica para superar a recalcitrância deste material e aumentar os rendimentos de hidrólise (envolvendo celulasas) visando à produção de bioetanol (Akin *et al.*, 2006). Neste sentido, pode-se sugerir que o bagaço de cana proveniente do tratamento com FAE de *A.clavatus* possui uma segunda vertente: encaminhamento para hidrólise enzimática total dos seus constituintes.

2.3.4. Quantificação dos compostos fenólicos liberados da biomassa lignocelulósica via tratamento enzimático e determinação de suas capacidades antioxidantes

Os compostos fenólicos totais (FT) e a capacidades de desativação do radical peroxil, derivados do tratamento enzimático com FAE em arabinoxilano de trigo e bagaço de cana, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Compostos fenólicos totais (FT) e a capacidade de desativação do radical peroxil, derivados do tratamento enzimático com feruloil esterase.

SUBSTRATO	FT (mg GAE/ L)	ORAC (mmol TE/L)
Arabinosilano de trigo	53,67 ± 1,17	921,44 ± 95,67
Bagaço de cana pré- tratado	14,16 ± 3,46	218,53 ± 30,62

Legenda: Os fenólicos totais (FT) e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) foram expressos como resultado do tratamento enzimático subtraído do ensaio controle, no qual empregou a enzima inativa. Os resultados de FT foram expressos em miligramas de ácido gálico por L de extrato e ORAC como mmol de equivalente de Trolox por L de extrato.

Foi observado que a hidrólise enzimática sobre o arabinosilano de trigo liberou maior quantidade de compostos fenólicos e que estes produtos apresentaram maior capacidade de desativação do radical ROO[•] em relação à hidrólise sobre o bagaço de cana. A correlação entre fenólicos totais e capacidade antioxidante foi previamente relatada em muitos estudos (Dias *et al.*, 2010; Castelo-Branco e Torres, 2011), considerando que o principal mecanismo de limpeza do radical ROO[•] é a transferência de átomo de hidrogênio pelos compostos fenólicos (Huang *et al.* 2005).

Os valores de capacidade antioxidante dos compostos fenólicos liberados enzimaticamente do bagaço de cana e arabinosilano de trigo foram superiores aos do vinho tinto (14,60 ± 5,75 mmol TE/L – Sánchez-Moreno *et al.*, 2003) e o chá preto (16,7 mmol TE/ L - Prior *et al.*, 1999) fontes ricas em substâncias antioxidantes (Prior *et al.*, 1999; Sánchez-Moreno *et al.*, 2003). Esses resultados reforçam que a biomassa lignocelulósica é uma fonte renovável adequada para obter compostos antioxidantes.

A maior liberação de fenólicos totais no arabinosilano de trigo pode ser explicada pela hipótese de que este substrato comercial é puro e, portanto, estava disponível em maior concentração e em menor complexidade para a hidrólise da FAE (Figura 21). Enquanto o substrato arabinosilano de trigo contendo esterificações ao ácido ferúlico estava integralmente disponível para o ataque enzimático, o bagaço, após pré-tratamento químico, continha em sua composição uma mistura heterogênea de arabinana, galactana, celulose, lignina e cinzas e

aproximadamente 33% de xilano, como determinado por Gonçalves *et al.*, (2011). Este pequeno percentual de xilano disponível no bagaço de cana continha uma variedade compostos fenólicos não determinados e em virtude da complexidade do material, pode ter ocorrido impedimento estérico, diminuindo o acesso da enzima às cadeias poliméricas e consequentemente diminuindo a hidrólise dos compostos fenólicos presentes.

Os monômeros e dímeros (5-5' DiFA) de ácido ferúlico liberados no tratamento enzimático do arabinoxilano de trigo foram responsáveis pelos valores da capacidade antioxidante. Já a capacidade antioxidante dos compostos extraídos do bagaço pode ser atribuída à presença de ácido ferúlico e dímeros além de outros compostos fenólicos que foram liberados no tratamento enzimático, que originalmente, se encontram associados à parede celular da cana (Dos Santos *et al.*, 2008).

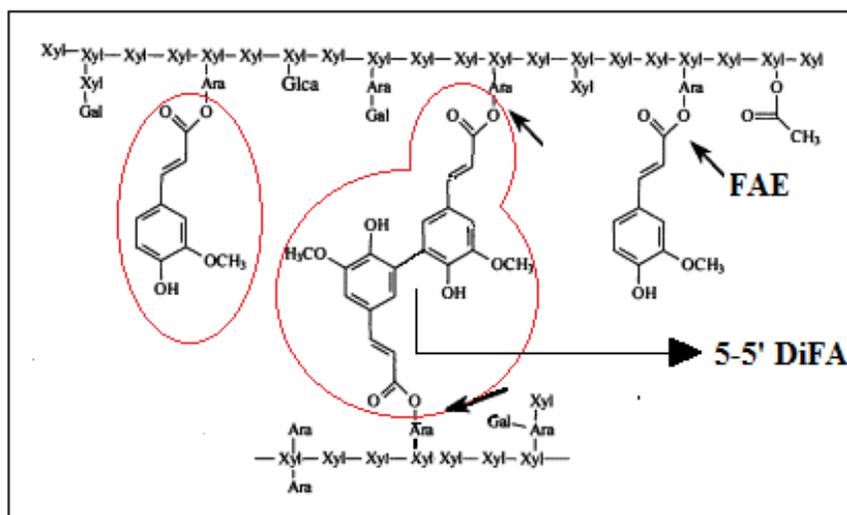


Figura 21: Representação esquemática da estrutura do arabinoxilano de trigo. As setas pequenas indicam os pontos onde a FAE atua. Como resultado de sua ação, há a liberação de monômeros e dímeros (5-5' DiFA) de ácido ferúlico, em destaque (Adaptada de Adams *et al.*, 2004). Legenda: Xyl (xilose) Ara (arabinose) Gal (galactose) Glca (glucosamina).

2.4. Conclusões

Os resultados obtidos sugerem, pela primeira vez na literatura, que uma feruloil esterase de *Aspergillus clavatus* clonada com sucesso no sistema de expressão *E.coli* possui potencial para ser aplicada na hidrólise da biomassa lignocelulósica a fim de produzir compostos fenólicos com valor agregado e ampla aplicação biotecnológica. Foi visto que por se tratar de uma esterase do tipo D, a enzima AcFAE possui a capacidade de hidrolisar dímeros e monômeros de ácido ferúlico esterificados às cadeias poliméricas de xilanos presentes em biomassas lignocelulósicas complexas, como o bagaço de cana, e ainda, esses produtos apresentam capacidade antioxidante. Foi analisado também que o pré-tratamento químico do bagaço de cana gerou uma biomassa mais susceptível ao tratamento enzimático.

É importante ressaltar que estes estudos não se limitam apenas a produção de compostos antioxidantes a partir do bagaço de cana dentre outros tipos de biomassa. O bagaço proveniente do tratamento enzimático com feruloil esterases pode sofrer tratamento de hemicelulases e celulases para a despolimerização total da parede, visando à produção do bioetanol, podendo ser proposto com um pré-tratamento enzimático, uma vez que estas enzimas clivam as pontes diferúlicas responsáveis pelo *cross linking* das cadeias de arabinoxilano e lignina, que por sua vez contribuem para a recalcitrância da parede celular.

2.5. Referências

Akin, D. E.; Morrison, W.H. III.; Rigsby, L.L.; Barton, F.E, II.; Himmelsbach, D. S.; Hicks, K.B. Corn stover fractions and bioenergy: chemical composition, structure, and response to enzyme pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 129, p.104–116, 2006.

Anderson, W. F.; Akin, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, v. 35, p.355–366, 2008.

Andreatta, A. A.; Ribeiro, C. C. Heuristic for the phylogeny problem. *J. of Heuristics*, v.8, p. 429-447, 2002.

Bartolome, B.; Faulds, C. B.; Kroon, P.A.; Waldron, K.; Gilbert, H.J.; Hazlewood, G.; Williamson, G. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa esterase (XylD) release a 5-5-ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl Environ Microbiol*, v. 63, p. 208–212, 1997.

Brasileiro, L. B.; Colodette, J.L.; Piló-Veloso, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Química Nova*, v. 24, p. 819-829, 2001.

Buanafina, M. M. O. Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives.

Molecular Plant, v. 2 (5), p.861–872, 2009.

Castelo-Branco, U. N.; Torres, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista Nutrição*, v.24, p.173-187, 2011.

Dias, A. L. S.; Souza, J. N. S.; Rogez, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante, *Química Nova*, v.33, p.38-42, 2010.

Dos Santos, W. D.; Ferrarese, M. L.; Nakamura, C.V.; Mourão, K. S.; Mangolin, C. A.; Ferrarese-Filho, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action, *J. Chem. Ecol.*, v.34, p.1230-1241, 2008.

Faria, A. M.; Bottoli, C.B.G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Química Nova*, v. 29, p.300-309, 2006.

Faulds, C. B.; Bartolomé, B.; Williamson, G. Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Industrial Crops and Products*, v.6, p.367-374, 1997.

Faulds, C. B.; Williamson, G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: Specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology*, v.140, p.779–787, 1994.

Fazary, A. E.; Ju, Yi-Hsu. The large scale use of Feruloyl Esterases in industry. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, v.3, p.95-110, 2008.

Franklin, G. Permanent preparations of macerated wood fibres. *Tropical Woods*, v.49, p.21-22, 1937.

Deschamps, F. C.; Ramos, L. P. Método para determinação de ácidos fenólicos na Parede Celular de forragens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, p. 1634-1639, 2002.

Gonçalves, T. A.; Damásio, A. R. L.; Segato, F.; Alvarez, T.M.; Bragatto, J.; Brenelli, L.B.; Citadini, A. P. S.; Murakami, M. T.; Ruller, R.; Paes Leme, A. F.; Prade, R. A.; Squina, F.M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. *Bioresour. Technol.*, v.119, p. 293–299, 2012.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 1841-56, 2005.

Johnson, D. C.; Int. Symp. Delignification with Oxygen, Ozone and Peracids, Raleigh, 1980.

Juang, H. G.; Allen, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p. 2774-2790, 1995.

Koseki, T.; Mimasaka, N.; Hashizume, K.; Shiono, Y.; Murayama, T. Stimulatory effect of ferulic acid on the production of extracellular xylanolytic enzymes by *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, v.71, p. 1785-1787, 2007.

Kroon, P. A.; Garcia Cones, M.T.; Fillingham, I. J.; Williamson, G. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food Agric.*, v.79, p.428-434, 1999.

Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N. M.; Archer, D. B; Belshaw, N. J. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *J. Biochemistry*, v.267, p. 6740-6752, 2000.

Martins, D. A. B.; Prado, H. F. A.; Leite, R. S. R.; Ferreira, H.; Moretti, M. M. S.; Silva, R. Gomes, E. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of

sugar for Bioethanol Production. *Integrated Waste Management*, v.2, Ed Mr. Sunilkumar. In teck, 427p, 2011.

Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food. Chem.*, v.49, pp. 4619-4626, 2001.

Ou, S.; Luo, S.; Xue, F.; Huang, C.; Zhang, N.; Liu, Z. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *J. of Food engineering*, v.78, p.1298-1304, 2007.

Prior, R. L.; Cao, G. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, v.220, p. 255-261, 1999.

Seabra, J. E. A. Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

Sánchez-Moreno, C.; Cao, G.; Ou, B.; Prior, R.L. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J. of Agric. and Food Chem*, v.51, p. 4889-4896, 2003.

Sterbova, D.; Vicek, J.; Kuban, V. Capillary zone electrophoretic determination of phenolic compounds in chess (*Bromus inermis L.*) plant extracts. *J. Sep. Science*, v.29, pp. 308-313, 2006.

Tavares, M.F.M. Mecanismos de separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v.20, p. 493-511, 1997.

Topakas, E.; Stamatis, H.; Biely, P.; Kekos, D.; Macris, B. J.; Christakopoulos, P. Purification and characterization of feruloil esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *J. of Biotechnonology*, v.102, p. 33-44, 2003.

Wong, D. S. W. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.133, p. 87-112, 2006.

CAPÍTULO 3 - Estudos sobre a atuação sinérgica entre endo-xilanase GH11 e uma arabinofuranosidase GH54 para produção de xilooligossacarídeos a partir de biomassa

3.1. Introdução

Neste capítulo estão descritos detalhadamente as estratégias e metodologias utilizadas para compreender o modo de atuação de uma endo-xilanase GH11 (XynC) e uma arabinofuranosidase GH54 (AbfB), ambas expressas em *Aspergillus nidulans*, na degradação da biomassa lignocelulósica.

Os estudos realizados não se limitaram apenas em compreender o modo de atuação dessas enzimas em coquetéis enzimáticos visando à produção de bioetanol, mas também visando a produção de xilooligossacarídeos, moléculas com interesse farmacêutico e alimentício obtidas via rota biotecnológica a partir de resíduos agroindustriais.

Os trabalhos anteriormente publicados sobre o tema genericamente descrevem endo-xilanases atuando sozinhas que hidrolisam incompletamente o xilano de Bétula (gênero de árvores da família Betulaceae) liberando majoritariamente oligossacarídeos contendo 3 ou 4 resíduos de xilose (xilotriose e xilotetraose) (Liu *et al.* 2006; Squina *et al.* 2009). Sørensen *et al.* (2007) e Alvira *et al.* (2011) reportaram o efeito sinérgico positivo entre endoxilanases e a-L-arabinofuranosidases na hidrólise de biomassa lignocelulósica. Neste sentido, o estudo avaliou o efeito sinérgico e o modo de operação destas enzimas na hidrólise do bagaço de cana e arabinoxilanos de centeio.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Expressão e purificação da XynC e AbfB

No presente estudo, foi utilizada uma XynC de *Penicillium funiculosum* e AbfB de *Aspergillus niger*, ambas expressas no fungo *A. Nidulans*, desenvolvidas em trabalho anterior (Segato *et al.*, 2012).

Os genes que codificam uma endo-xilanase de *Penicillium funiculosum* (XynC) e uma arabinofuranosidase de *Aspergillus niger* (AbfB) foram transferidos para o organismo modelo *Aspergillus nidulans*. O vetor de expressão pEXPYR (Figura 22) foi utilizado para a superexpressão heteróloga das duas enzimas. Este vetor foi modificado a partir do plasmídeo pFE2 o qual apresenta o gene *pyrG* de *Aspergillus niger* como descrito por Segato *et al.*, (2012).

Este sistema de expressão contém sítios de restrição para as enzimas NotI e XbaI, e permite a expressão da proteína conduzida pelo promotor e secreção da glucoamilase com base na sequência sinal da glucoamilase nativa.

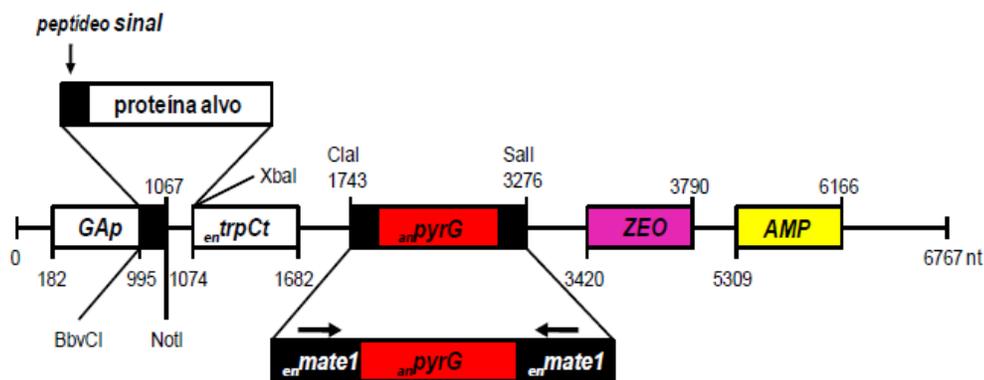


Figura 22: Mapa do vetor pEXPYR: um versátil sistema de expressão, que pode ser utilizado para produção de proteínas em fungos filamentosos. O sistema pEXPYR inclui características convenientes como um promotor induzível por maltose, uma sequência de peptídeo sinal para secreção, duas marcas de seleção que permitem seleção tanto positiva quanto negativa, respectivamente para resistência a zeomicina e um gene de marca auxotrófica PyrG de *A. niger*.

O protocolo seguido foi: as estirpes recombinantes de *A. nidulans* expressando XynC e AbfB foram paralelamente cultivadas em 500 mL de meio mínimo suplementado com piridoxina e 2% de maltose como indutor (Hartwig *et al.* 1991) por 48 horas a 37°C sob condições estáticas. Os micélios foram filtrados com papel de filtro (Whatman n°1) e os extratos brutos foram concentrados através de uma membrana de Amicon® (corte de 10KDa - Millipore). O tampão foi trocado por SAB pH 6,0 (50mM) para XynC, e por este mesmo tampão acrescido de NaCl (20mM) para AbfB. As duas enzimas foram primeiramente purificadas pela técnica de cromatografia de filtração em gel utilizando o sistema automatizado AKTA Purifier (GE Healthcare®) e coluna Superdex G-75 (GE Healthcare®). Os tampões de corrida empregados foram SAB pH 6,0 (50mM) para XynC, e este mesmo tampão acrescido de NaCl (20mM) para AbfB e taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ para XynC e 0,5 mL.min⁻¹ para AbfB. Em sequência, as enzimas foram purificadas pela técnica de troca aniônica empregando uma Resource Q (1mL, GE Healthcare®). O tampão de corrida empregado foi Tris-HCl 50 mM/ NaCl 100mM pH 6,0 e taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ para XynC e 0,5 mL.min⁻¹ para AbfB. As frações correspondentes às

duas enzimas (monitoradas a 280 nm) foram agrupadas e estocadas adequadamente. As frações correspondentes às duas enzimas (monitoradas a 280 nm) foram analisadas por Eletroforese Desnaturante em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras de proteína (15 µL de) foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos, na presença de solução desnaturante (5 µL) e aplicadas em gel de proliacrilamida 15 % utilizando um sistema vertical. A corrida foi conduzida em tampão Tris-glicina 1x à voltagem constante (100 v). A solução desnaturante foi preparada a partir de 2,4 mL de Tris-HCl pH 6,8 1 M, 3,0 mL de SDS 20%, 3 mL de glicerol 20%, 1,6 mL de β-mercaptoetanol e 0,06 g de azul de bromofenol. A avaliação da atividade das duas enzimas foi realizada conforme Squina *et al.*, 2009.

3.2.2. Ensaio de sinergia entre XynC e AbfB

Os substratos naturais empregados para as reações enzimáticas foram bagaço de cana de açúcar pré-tratado (como descrito no item 2.2.5.) e arabinoxilano de centeio (Megazyme) solúvel contendo em sua composição 38% de arabinose, 59% de xilose e 3% de outros açúcares (informação fornecida pelo fabricante).

A reação enzimática consistiu em 50 µL de substrato (0,5% m/v em água MilliQ) com 50 µL de solução enzimática contendo apenas XynC ou AbfB ou ambas (concentração final de 350 nM de XynC e 790 nM de AbfB) em tampão SAB pH 5,0 (100 mM) incubada (Thermomixer Comfort) a 50°C e 1000 rpm durante 5 horas para o bagaço e 2 horas para o arabinoxilano de centeio. Após os tempos estipulados, as reações foram centrifugadas a 12000 g por 10 min e o sobrenadante foi separado da biomassa.

O sobrenadante resultante da reação com polpa de bagaço de cana foi analisado por cromatografia de troca aniônica-pulsada de alta performance com detecção amperométrica (HPAE-PAD) para detectar os oligossacarídeos liberados pela ação das enzimas XynC e AbfB atuando sozinhas ou em sinergia. A separação foi realizada com a utilização de um aparelho Dionex ICS 3000 como uma coluna CarboPac PA1-100 (4 x 250mm) Dionex e uma pré coluna CarboPac PA1 (4 x 50mm) com um gradiente linear de NaOH 200mM de 5-36% de 0-17min, 36-51% de 18-43 min e 51-5% de 44-48 min em tampão SAB (500mM) por 15 minutos com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. As áreas dos picos no HPAE-PAD foram utilizadas para determinar a atividade sinérgica usando o software Dionex Chromeleon 6.8. As áreas baseadas na integração dos picos foram ajustadas com base nos padrões de xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose

e xilohexaose da Megazyme.

Os oligossacarídeos liberados, presentes no sobrenadante da reação com o arabinoxilano de centeio foram derivatizados com o ácido 8-aminopirene-1,3,6-trissulfônico (APTS) através de uma reação de redução de aminas, conforme descrito por Evangelista *et al.*, 1995, onde 5 µL de sobrenadante reagiu com 0,5 µL de APTS 0,1M (em ácido acético 25%), 0,5 µL de ácido acético 25% e 0,5 µL de cianoborohidreto de sódio 1M (em DMSO). O tubo foi centrifugado rapidamente e aquecido a 80°C durante uma hora. A mistura foi diluída em água e analisada por CZE.

A análise dos oligossacarídeos pela técnica de CZE foi realizada em um sistema P/ACE™ MDQ (Beckman® Coulter) com detecção de fluorescência induzida por laser utilizando como coluna um capilar de sílica fundida (TSP050375, Polymicro Technologies) com diâmetro interno de 50 µm e 31 cm de comprimento. As condições da corrida foram: tempo de injeção de 0.5 segundos, voltagem fixa de 15 kV, fosfato de sódio pH 2,5 (0,1 M) como tampão de corrida e temperatura controlada de 20° C. Os oligômeros marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro com banda de 520 nm. A informação combinada foi obtida do comportamento eletroforético e co-eletroforese com os padrões de mono de degradação das duas enzimas.

O grau de sinergia entre a XynC e AbfB para cada produto de hidrólise foi calculado como descrito em Raweesri *et al.* (2008) onde a área referente ao pico do produto (nC.min) resultante da ação das duas enzimas em conjunto foi dividida pela soma das áreas de cada pico (nC.min) do mesmo produto resultante da ação de cada enzima separadamente. Os picos não detectados assumiram valor “zero” no cálculo.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Avaliação da sinergia entre XynC e AbfB sobre a biomassa

O bagaço de cana empregado nos ensaios de sinergia foi tratado quimicamente com ácido acético e peróxido de hidrogênio (1:1) e teve a sua composição determinada pela técnica HPAE-PAD por Gonçalves *et al.* (2012) apresentada na Tabela 3. É possível observar que após este tratamento, o bagaço ainda continha aproximadamente 2% de lignina em sua composição, porém era esperado que este bagaço estivesse mais susceptível à hidrólise enzimática pelo fato de que este tratamento expõe as cadeias de xilano.

Tabela 3: Composição química do bagaço de cana pré- tratado pela técnica HPAE-PAD.

Componente	Teor (% p/p)
Arabinana	2,52 ± 0,04
Galactana	0,68 ± 0,01
Celulose	59,88 ± 1,08
Xilano	32,47 ± 0,54
Lignina	2,14 ± 0,12
Cinzas	0,56 ± 0,00

Os efeitos sinérgicos entre as enzimas XynC e AbfB sobre o bagaço de cana para a produção de XOS, após 5 h de hidrólise a 50°C foram observados. Os ensaios foram realizados a 50°C, temperatura em que ambas são estáveis e trabalham com eficiência.

Os produtos liberados foram analisados por HPAE-PAD e a atividade enzimática foi calculada como resultado a área dos picos dos cromatogramas (nC.min) integradas com base nos padrões (Tabela 4).

Tabela 4: Hidrólise sinérgica do bagaço de cana por XynC e AbfB. A análise foi realizada através da técnica HPAE-PAD nas condições descritas no texto.

Produto da hidrólise	Area nC.min			Grau de sinergia
	AbfB	XynC	AbfB+XynC	
arabinose	1,30± 0,05	Nd	5,19 ± 0,30	4,10
xilose	Nd*	5,21 ± 0,15	8,70 ± 0,17	1,67
xilobiose	Nd	2,98 ± 0,21	4,60 ± 0,22	1,54
xilotriose	Nd	3,81 ± 0,14	6,86 ± 0,28	1,79
xilotetraose	Nd	2,40 ± 0,05	4, 43 ± 0,11	1,85
xilopentaose	Nd	2,21 ± 0,04	3,80 ± 0,09	1,71
xilohexaose	Nd	1,29 ± 0,05	2,40 ± 0,09	1,82
xiloheptaose	Nd	1,21 ± 0,07	2,07 ± 0,13	1,71
xilooctaose	Nd	0,83 ± 0,03	1,52 ± 0,05	1,82
xilononaose	Nd	0,67 ± 0,04	1,18 ± 0,05	1,76

*não detectado

Analisando os dados da Tabela 4 é possível concluir que a AbfB atuando sozinha, possui apenas a capacidade de hidrolisar ligações α -L-arabinofuranosídicas, liberando arabinose. A XynC atuando sozinha, libera principalmente XOS contendo de 2 a 9 resíduos de xilose, porém não libera arabinose. A AbfB e XynC atuando em sinergia, a liberação de arabinose é aumentada em cerca de 4 vezes (aproximadamente 300%). Esse resultado sugere que a AbfB atua com maior eficiência em cadeias menores de XOS ramificados com resíduos de arabinose do que na cadeia principal de xilano. A liberação de xilose é aumentada cerca de 1,67 vezes (aproximadamente 67%) e os XOS entre 1,5 a 1,85 vezes com a AbfB e XynC atuando em sinergia.

Tem-se conhecimento de que, dentre os fatores que dificultam a ação das endo- β -1,4-xilanases, a presença de eventuais substituições de xiloses por arabinoses (ou acetilação e ligações cruzadas com compostos fenólicos) provocam restrições físicas ao acesso das enzimas de despolimerização à cadeia principal de xilano (Knob *et al.*, 2010).

Desta forma, o efeito sinérgico positivo observado entre as duas enzimas na hidrólise do bagaço de cana deve-se ao fato de que a ação da AbfB sobre as cadeias de xilano provoca o aumento

de sítos de ligação para a XynC e diminuição do impedimento estérico. Já ação da endoxilanase dentro das cadeias de xilano geram oligomêros que são degradados preferencialmente pela AbfB. A Figura 23 ilustra simplificada os sítios de ligação das duas enzimas.

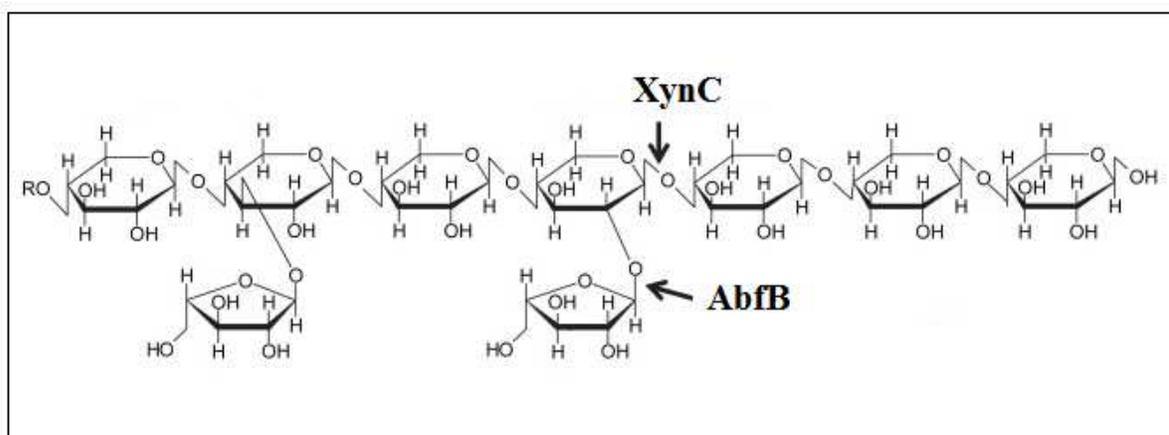


Figura 23: Estrutura simplificada do arabinoxilano e os sítios de ataque (indicado com flechas) das enzimas XynC e AbfB (Adaptada de Dornez *et al.*, 2009).

Alvira *et al.* (2011) avaliou o efeito sinérgico de uma endoxilanase (XynC) de *A. nidulans* e uma α -L-arabinofuranosidase (AbF) de *A. niger* em combinação com uma mistura de celulases na hidrólise enzimática de palha de trigo explodida a vapor. Os resultados positivos revelaram que as duas enzimas, XynC e AbF melhoraram a digestibilidade da celulose, aumentando a eficiência do processo de hidrólise, uma vez que a produção de glicose, xilose e arabinose aumentaram 19.5%, 18.6% e 22.1% respectivamente, após 72 horas de hidrólise e também foi observado um grau de sinergismo de 29.5% entre todas as enzimas presentes. O estudo confirma que essas duas enzimas possuem potencial para serem empregadas juntamente com celulases no processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Os efeitos sinérgicos entre as duas enzimas em estudo sobre o arabinoxilano de centeio também foram observados através da técnica de CZE (Figura 24). Os resultados obtidos corroboraram com perfil de hidrólise obtido utilizando o bagaço de cana como substrato: XynC atuando separadamente, liberou majoritariamente xilobiose, xilotriose e xilotetraose e a AbfB liberou apenas arabinose. É possível observar que no perfil eletroforético de hidrólise da XynC existem picos (indicados por flechas na Figura 24) que são menos intensos ou desaparecem

quando ambas as enzimas estavam presentes. O pico referente à arabinose/xilose foi mais intenso após a ação das duas enzimas, sugerindo que XOS ramificados com resíduos de arabinose foram degradados preferencialmente quando as enzimas foram combinadas. Ou seja, o efeito sinérgico que resultou no aumento da liberação de XOS está correlacionada à ação da AbfB principalmente no XOS ramificados com resíduos de arabinose, subsequentemente aumentando o acesso da XynC nestes oligossacarídeos e maior produção de XOS pela ação da XynC.

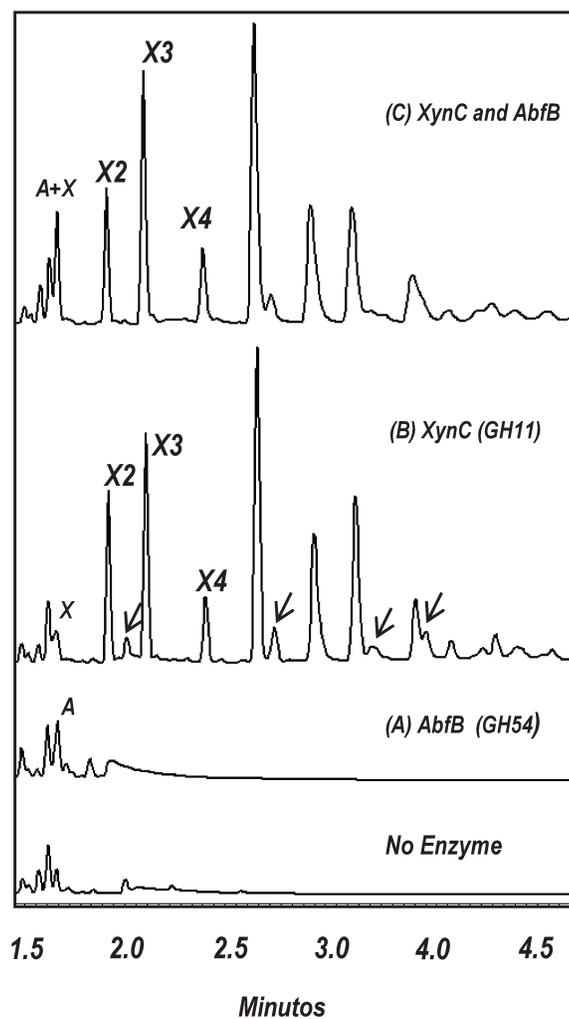


Figura 24: Eletrocromatograma referente aos ensaios de sinergia entre as enzimas XynC e AbfB sobre o arabinoxilano de centeio.

As informações obtidas empregando as técnicas de CZE e HPAE-PAD foram coerentes com a literatura, bem como ampliaram o conhecimento sobre o modo de ação principal destas duas classes de enzimas (GH11 e GH54) na degradação de xilano. Sørensen *et al.* (2007) reportou previamente os efeitos sinérgicos de uma mistura enzimática comercial (Ultraflo L[®] – Novozymes A/S) contendo α -L-arabinofuranosidase e endo-1,4- β -xylanase sobre a degradação do arabinoxilano de trigo insolúvel (AT). O tratamento empregando Ultraflo L[®] mais uma mistura de celulases (Celluclast 1.5 L[®] – Novozymes A/S) aumentou em 130% a liberação de xilose em 48 h de hidrólise em comparação com o AT tratado com as duas misturas enzimáticas separadamente. Foi observado que o tratamento com Ultraflo L[®] gerava altas concentrações de xilobiose e xilotriose, porém, quando o AT era tratado com as duas misturas enzimáticas, a concentração destes XOS era significativamente diminuída no meio e a concentração de xilose era aumentada, indicando que as enzimas presentes no Celluclast 1.5 L[®] atuaram sinergicamente com a α -L-arabinofuranosidase e Endo-1,4- β -xylanase presente no Ultraflo L na hidrólise do xilano.

3.4. Conclusões

Os dados mostraram que a endo-xilanase (GH11) e uma arabinofuranosidase (GH54) secretadas por um sistema de expressão no fungo *A.nidulans* apresentam aplicação biotecnológica: o efeito sinérgico destas enzimas sobre a biomassa lignocelulósica possui potencial para produção de xilooligossacarídeos. Além dos benefícios terapêuticos dos xilooligossacarídeos na flora intestinal, a xilobiose também pode ser empregada para adoçar alimentos, porque possui grau de doçura de 30% em relação à sacarose e baixa caloria (Meneses e Durrant, 2008). Estes compostos são comprovadamente denominados de prebióticos e por esta razão, pode ser usados como ingredientes ativos em alimentos funcionais (Clydesdale, 1997; Moura *et al.*, 2007).

3.5. Referências

Alvira, P.; Negro, M. J.; Ballesteros, M. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 102, p.4552–4558, 2011.

Clydesdale, F. M. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutrition Research*, v.55, p.413-423, 1997.

Damásio, A. R. L.; Silva, T. M.; Almeida, F. B. R.; Squina, F. M.; Ribeiro D, A.; Leme, A. F. P.; Segato, F.; Prade, R.A.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; Polizeli, M. L. T. M. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. *Process Biochem*, v. 46, p.1236-1242, 2011.

Dornez, E.; Gebruers, K.; Delcour, J.A.; Courtin, C.M. Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends in Food Science & Technology*, v.20, p. 495–510, 2009.

Gonçalves, T. A.; Damásio, A. R. L.; Segato, F.; Alvarez, T. M.; Bragatto, J.; Brenelli, L. B.; Citadini, A. P. S.; Murakami, M.T.; Ruller, R.; Paes Leme, A. F.; Prade, R. A.; Squina, F. M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. *Bioresour. Technol.*, v.119, p. 293–299, 2012

Knob, A.; Terrasan, C.; Carmona, E. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J. of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 389-407, 2010.

Menezes, C. R., Durrant, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde. *Ciência rural*, v.30, p.587-592, 2008.

Moura, P; Barata, R.; Cavalheiro, I.; Gírio, F.; Lourenço Dias, F.; Paula Esteves, M. In vitro fermentation of xylooligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Science and Technology*, v.40, p. 963-972, 2007.

Raweesri, P.; Riangrunrojana, P.; Pinphanichakarn, P. a-L-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresource Technology*, v. 99, p.8981–8986, 2008.

Squina, F. M.; Mort, A.J.; Decker, S.R.; Prade, R.A. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. *Protein Expr. Purif*, v.68, p. 65–71, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste presente estudo foram empregadas três enzimas recombinantes, uma feruloil esterase de *A. clavatus* (AcFAE) expressa em *E.coli*, uma endo-xilanase (XynC) de *P. funiculosum* e arabinofuranosidase (AbfB) de *A. niger*, ambas expressas no fungo *A. nidulans*. Essas enzimas tiveram suas atividades avaliadas sobre diversos tipos de biomassas vegetais a fim de avaliar a produção de compostos fenólicos antioxidantes e xilooligossacarídeos.

A AcFAE foi capaz de produzir ácido ferúlico e outras substâncias antioxidantes a partir de arabinoxilano de centeio e bagaço de cana *in natura*. O pré-tratamento químico deste bagaço de cana com ácido acético e peróxido de hidrogênio mostrou ser adequado para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática. A XynC e AbfB, atuando em sinergia, foram capazes de produzir xilooligossacarídeos a partir de arabinoxilano de centeio e do bagaço de cana.

Este trabalho também contribuiu para uma melhor compreensão de como as enzimas, FaeD, XynC e AbfB atuam sobre a complexa estrutura da biomassa a fim de despolimerizá-la. O fato de elas possuírem diferentes atividades catalíticas sugere que essas três enzimas apresentam potencial não somente para otimização do processo produção de ácidos fenólicos e xilooligossacarídeos do bagaço de cana e outras biomassas lignocelulósicas, como também como pré-tratamento enzimático deste bagaço e outros resíduos agrícolas para a produção de biocombustíveis. Entretanto, mais estudos buscando a otimização da produção destas enzimas por microrganismos ainda se fazem necessários. Posteriormente, também serão necessários estudos visando ampliação de escala do processo de hidrólise enzimática para aplicação destes processos biotecnológicos industriais.

ANEXO 1

Manuscrito de revisão submetido para publicação para *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*

Esta revisão reúne as publicações mais relevantes nos últimos vinte anos sobre os efeitos positivos do ácido ferúlico e derivados sobre o organismo, bem como as fontes dietéticas deste composto, seu perfil farmacocinético e mecanismo de ação como antioxidante, a fim de elucidar seu potencial terapêutico.

Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field (Review)

Lívia Brenelli de Paiva¹, Rosana Goldbeck¹, Wanderley Dantas dos Santos², Fabio Marcio Squina^{1*}

¹National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP – Brazil

²Plant Biochemistry and Bioenergy Laboratory, Department of Agronomical Sciences, State University of Maringá (UEM), Umuarama, PR, Brazil.

*Email: fabio.squina@bioetanol.org.br

National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Giuseppe Máximo Scolfaro Street 10.000 -Guará - District Barão Geraldo, Campinas, SP – Brazil

Abstract

Ferulic acid is a phenolic acid widely distributed in the plant kingdom. It presents a wide range of therapeutic effects including treatments against cancer, diabetes, lung and cardiovascular diseases, as well as hepatic, neuro and photoprotective effects and antimicrobial and anti-inflammatory activities. Overall, ferulic acid pharmaceutical potential can be attributed to its ability to scavenge free radicals. However, recent studies has revealed that ferulic acid presents pharmacological properties beyond those related with their antioxidant activity as the ability to competitively inhibit HMG-reductase and activate glucokinase contributing to reduce hypercholesterolemia and hyperglycemia, respectively. The present review addresses ferulic acid dietary sources, pharmacokinetic profile, action mechanisms as antioxidant and positive effects in the treatment and prevention of various diseases, in order to provide a basis for understanding its mechanisms of action as well as its pharmaceutical potentials.

Uniterms: ferulic acid, properties, antioxidant, diseases, pharmaceutical functions.

Resumo

O ácido ferúlico é um ácido fenólico amplamente distribuído no reino vegetal. Ele apresenta uma ampla gama de efeitos terapêuticos, incluindo tratamentos contra o cancer, diabetes, doenças pulmonares e cardiovasculares, bem como efeitos hepáticos, neuro e fotoprotetores, atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias. O potencial farmacêutico do ácido ferúlico pode ser atribuído à sua capacidade em sequestrar radicais livres. No entanto, estudos recentes revelaram que o ácido ferúlico apresenta propriedades farmacológicas, além da sua atividade antioxidante, como a capacidade de inibir competitivamente a HMG-redutase e ativar a glucoquinase, contribuindo para reduzir a hipercolesterolemia e hiperglicemia, respectivamente. A presente revisão aborda fontes dietéticas de ácido ferúlico, o perfil farmacocinético, os mecanismos de ação como antioxidante e efeitos positivos no tratamento e prevenção de várias doenças, de modo a proporcionar uma base para a compreensão dos seus mecanismos de ação, bem como os seus potenciais farmacêuticos.

Unitermos: ácido ferúlico, propriedades, antioxidante, doenças, funções farmacêuticas.

INTRODUCTION

Natural antioxidants exhibit therapeutic potential for a variety of diseases such as cancer, diabetes, and cardiovascular and neurodegenerative diseases (Kayahara *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Soobrattee *et al.*, 2005) where free radicals play a key role in development (Prior *et al.*, 1998). Recently, there has been increased public and scientific interest to employing natural antioxidants instead of synthetic antioxidants, due to their potential adverse effects on health which include carcinogenicity (Ito *et al.*, 1983; Würtzen, 1990; Osawa *et al.*, 1990).

Antioxidants found in vegetables can act as abductors, reducing agents, enzyme inhibitors, metal chelators or free radicals scavengers (Wang *et al.*, 2000). Phenols are widely distributed in the plant kingdom and diet vegetables. There are found in significant concentrations in fruits, vegetables and beverages and have been revealed as effective antioxidants (Clifford, 1999; Pimentel *et al.*, 2005).

Ferulic acid (Figure 1) is one of the most abundant phenolic acids in plants and might be found in high concentrations in foods as navy bean, corn bran, wheat bran, eggplant, artichokes and beets (Rosazza *et al.*, 1995; Kroon *et al.*, 1997; Rechner *et al.*, 2001; D'archivio *et al.*, 2007).

It can be found free, dimerized or esterified with proteins and polysaccharides in the cell wall, such as arabinoxylans in grasses and xyloglucans in bamboo (Iiyama *et al.* 1994; Rumbold *et al.*, 2003; Fazary & Ju., 2007). Ferulic acid (FA) is an important biological and structural component of the plant cell wall. Thanks to its ability to stop radical chain reactions by resonance followed by polymerization, FA offer protection against UV-radiation and are responsible for the cross-linking polysaccharides and other cell wall polymers (Sánchez *et al.*, 1996; Kroon *et al.*, 1999, dos Santos *et al.* 2008).

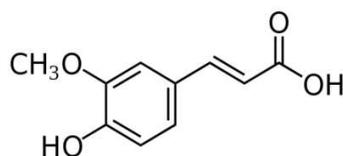


FIGURE 1 - Chemical structure of Ferulic Acid (FA)

FA can be obtained from the cell walls of plants using alkaline chemical treatment (Taniguchi *et al.*, 1999) or biotechnological treatment employing feruloyl esterases (EC 3.1.1.73) a subclass of the carboxylesterases produced by microorganisms that are able to hydrolyze ester bonds formed between cell wall polysaccharides and FA or its dimers, but more research is necessary to make this biotechnology route economically attractive (Faulds *et al.*, 1997; Kroon *et al.*, 1999; Wong, 2005; Damásio *et al.*, 2012). These enzymes have been produced and purified from a wide range of micro-organisms, including bacteria and fungi as *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces stipitatus*, *Aspergillus niger* (Faulds *et al.*, 1995; De Vries *et al.*, 2002).

FA has received much attention in oriental research where FA has been used as antioxidant in food additives in Japan (Itagaki *et al.*, 2009) and especially in medical studies in China after FA has being proven as an effective component of the medicinal herbs used by Chinese traditional medicine, such as *Angelica sinensis*, *A. cimicifuga* and *A. heracleifolia lignsticum chuangxiang* (Sakai *et al.*, 1999). FA can be absorbed by the small intestine and excreted in the urine, where therapeutic efficacy is dependent on its physiological concentrations and pharmacokinetic properties, which include absorption, distribution, metabolism and excretion of metabolites (Choudhury *et al.*, 1999). The present article updates the therapeutic properties of

FA reviewing its sources, mechanisms of action and pharmacokinetics in order to concisely subsidy researchers interested in the field.

Natural sources

FA [3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid] may be found as a monomer, dimer or oligomer free or as component of polymers, covalently linked by ester bonds with polysaccharides, polyamines and glycoproteins, as well as ether linked to lignin (Durán & Padilla, 1993; Bourne & Rice-Evans, 1998; Kroon *et al.*, 1999). FA has two isomers: cis (yellow oily liquid) and trans (white crystal), the last corresponding to 90 % of its natural occurrence (Fulcher, 1983). It is synthesized in the shikimate/phenylpropanoid pathway mainly from L-phenylalanine or, in grasses, from L-tyrosine (Figure 2). The phenylpropanoid path starts with deamination of L-phenylalanine to produce cinnamic acid, a reaction catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Cinnamic acid is hydroxylated to give *p*-coumaric acid, in a reaction catalyzed by cinnamyl 4-hydroxylase (C4H). Alternatively, L-tyrosine deamination, catalyzed by tyrosine ammonia lyase (TAL) produces the *p*-coumaric acid, directly (Castelluccio *et al.*, 1995). *p*-Coumaric acid is then esterified to coenzyme A by the enzyme 4-coenzyme A ligase (4CL), transesterified with shikimate or quinate by hydroxycinnamoyl CoA: quinate/shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) and further hydroxylated in carbon 4 to produce caffeoyl-shikimate/quininate ester by the enzyme coumaroyl-3-hydroxylase (C3H). Caffeoyl-shikimate/quininate is transesterified with CoA and methylated in the hydroxyl from C3 by cinnamoyl-coenzyme A orthomethyl transferase to produce feruloyl-CoA. The ester might be exported to feruloylate polysaccharides in Golgi apparatus by action of a putative feruloyl transferase or released as coniferaldehyde in a reaction mediated by cinnamoyl-coenzyme A reductase (CCR). The free FA is produced by the subsequent oxidation of coniferaldehyde by the enzyme coniferyl aldehyde dehydrogenase (CALDH) (Chen, 2006).

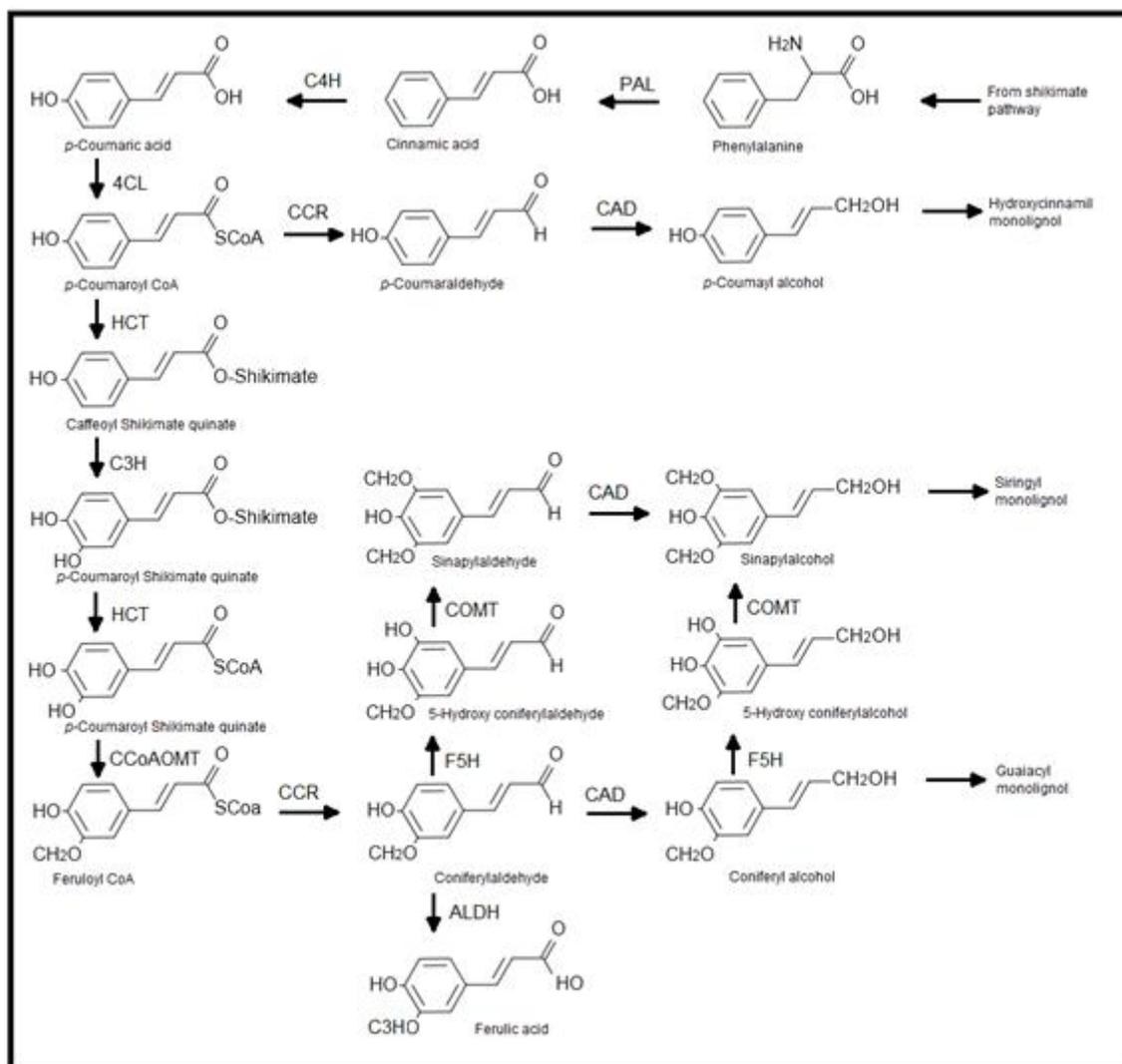


FIGURE 2 – Simplified phenylpropanoid pathway. PAL, phenylalanine ammonia-lyase, C4H, cinnamate-4-hydroxylase, 4CL, 4-coumarate:CoA ligase, HCT, hydroxycinnamoyl CoA: quinate/shikimate hydroxycinnamoyl transferase, C3H, coumarate-3-hydroxylase, CCoAOMT, caffeoyl coenzyme A 3-Omethyltransferase, CCR, cinnamoyl CoA reductase, F5H, ferulate 5-hydroxylase, COMT, caffeic acid O-methyltransferase, CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase, ALDH, aldehyde dehydrogenase (Dos Santos *et al.*, 2008).

High concentrations of FA may occur in common foods, such as corn bran (2610-3300 mg/100 g), wheat bran (1358-2293 mg/100 g), maize bran (3000 mg/100g), banana (5.4 mg/100 g), bamboo shoots (243.6 mg/100 g), eggplant (25 mg/100 g), orange (9.2-9.9 mg/100g), beets (800 mg/100 mg) as well as in broccoli, spinach, cabbage, potatoes, carrots, tomatoes, coffee, natural extracts of herbs and a range of fruits and vegetables (Kroon *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2005; Mattila *et al.*, 2005; Matilla *et al.*, 2006; Liyana & Shahidi, 2006; Mattila *et al.*, 2007).

The esters of hydroxycinnamic acids and quinic acid produced by HCT (Figure 2) are also generically named chlorogenic acid whose the commonest is 5-*O*-caffeoyl quinic acid (Clifford, 1999). It is present in particularly high concentrations in numerous foods and beverages such as coffee, pears, potato tubers and apple, and as a consequence in derived by products. Analysis of the coffee pulp (the solid residue from coffee processing) indicated that chlorogenic acid (around 40 %) is the main phenolic compounds (Pandey *et al.*, 2000).

The industrial use of hidroxycinnamates has attracted growing interest for several years since they and their conjugates were shown to be bioactive molecules, possessing potential antioxidant activities and health benefits. The extraction of these phenolic compounds from biomass throughout the breakdown of the ester linkages with polymers has allowed the exploitation of such compounds for pharmaceutical, industrial and food applications (Benoit *et al.*, 2006).

Pharmacokinetic

A person can ingest from 80-165 mg of FA in a meal. FA is present in food as a conjugated form and a free form (Rondini *et al.*, 2004). Both free and linked FA are quickly absorbed from the stomach without its change due to acid pH, according to studies carried out *in situ* in the rat stomach, but it was verified that only the free form of the acid was absorbed by the intestine after administration of 8 μ mol FA / kg body weight (Zhao *et al.*, 2004).

Digestion of FA involves xylanases (EC 3.2.1.8), feruloyl (EC 3.1.1.73) and cinnamoyl (EC 3.1.1.1) esterases (Kroon *et al.*, 1997). The absorption of FA occurs mainly in the colon by passive diffusion (*c.* 90%), or by active transport via the monocarboxylic acid transporter (MCT) (Poquet *et al.*, 2008). Studies have shown FA absorption rate is high, with peak plasma concentration attained within 15-30 min after digestive administration of FA. Only 0.5-0.8 % is

found in excrement of mice (Zhao *et al.*, 2003). After absorption, about 50 % of FA is aimed at the liver, and the remainder is distributed in the bloodstream, the gastric mucosa and peripheral tissues (Adam *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004; Silberberg *et al.*, 2006).

Chang *et al.* (1993) administered pure FA in Wistar rats and ascertained that the free acid did not enter the enterohepatic circulation. Conjugation was required for its distribution in the organism. The conjugation reactions of FA occur mainly in the liver but may also occur in the intestine mucosa or kidney being catalyzed by sulfotransferases (EC 2.8.2.1) and UDP glucuronosyl transferases (EC 2.4.1.17) (Piskula & Terao, 1998; Kern *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Studies in humans and rats showed that after oral intake of FA, the most abundant metabolites generated in plasma were FA-glucuronide (FA conjugate with glucuronic acid) and FA-sulfoglucuronide (FA conjugate with sulfate and glucuronide) in addition to unmodified FA. The studies indicated that concentrations of metabolites derived from FA ingestion depend on several factors such as the dose and route administered, as well as the animal species. (Zhao *et al.*, 2003; 2004).

Free phenolic acids can be absorbed via paracellular transport and active transport mediated by monocarboxylic acids transporters (MCT) in the gastrointestinal mucosa. According Konishi *et al.* (2006) the absorption efficiency of each phenolic acid depends on its affinity for the MCT. To elucidate the different affinities, different phenolic acids were administered in the rats' stomach at concentration of 2.25 mmol L⁻¹ and plasma concentrations were measured. The plasma concentration rate increases in the following order: gallic acid = chlorogenic acid < caffeic acid < p-coumaric acid = FA, which corresponds to their affinities to MCT. Peak levels of FA occur within 5 min after administration.

In rats, FA and its metabolites are predominantly excreted in urine, but about 4-6% of the ingested dose may be excreted through bile (Adam *et al.*, 2002). Excretion might occur 1.5 h after administration of the acid (Rondini *et al.*, 2002), while in humans only 7-9 h after consumption (Bourne & Rice-Evans, 1998). However, in both rats and humans the rate of unmodified FA recovered in urine is only 4-5% of the ingested acid (Bourne & Rice-Evans, 1998; Rondini *et al.*, 2002). Urinary excretion of FA is influenced by its combination, where the elimination rate of the acid after consumption of wheat bran was 15 times slower than after the consumption of the free molecule (Rondini *et al.*, 2002). Conclusive studies on pharmacokinetics

and bioavailability of FA and its conjugated forms in humans are necessary so that it may be utilized as a nutrient supplement administered orally in its free form or bound to sugars in order to improve its absorption and interaction with target tissues, increasing its efficiency in preventing or treating chronic diseases.

Radical scavenger properties

Free radicals may be defined as organic and inorganic molecules or atoms which contain one or more unpaired, independently existing electrons (Halliwell, 1994). They present short half-life and are very reactive. Found in all biological systems, they are continuously generated by several physiological processes from either endogenous or exogenous sources. The activity of oxidases, dehydrogenases, peroxidases and the presence of transition metals in the cell give rise to free radicals and are considered to be endogenous sources. Tobacco, air pollution, organic solvents, anesthetics, pesticides, gamma rays and ultraviolet are examples of exogenous sources (Soares, 2002).

The uneven balance between oxidant and antioxidant molecules, that results in the induction of cell damage by free radicals, is referred to as oxidative stress (Sies, 1993) and can trigger a series of chronic degenerative diseases such as arthritis, atherosclerosis, diabetes, cataracts, chronic inflammations, brain dysfunction, aging, cancer and others (Bianchi & Antunes, 1999). An antioxidant is defined as "any substance that when present in low concentrations compared to the oxidizable substrate effectively delays or inhibits the oxidation of the substrate." In organisms, antioxidants are agents responsible for inhibition and reduction of injuries caused by free radicals in cells (Sies, 1993; Sies & Stahl, 1995).

The antioxidant potential of FA can be attributed to the formation of a methoxy radical from the phenolic nucleus. Due to its potential displacement in resonance structures, such a radical has low energy generating a more stable hybrid resonance structure (Figure 3). In the reactive collision of FA with a free radical, the hydrogen atom of the acid is easily transferred to the radical, forming a phenoxy radical that is highly stabilized since the unpaired electron may be present not only on the oxygen but it can be delocalized across the entire molecule. This phenolic radical is unable to initiate or propagate a radical chain reaction and its fate is a collision and condensation with another ferulate radical to yield the dimer curcumin and other dimers. The

presence of the extended side chain enhances stabilization of the conjugated methoxy radical, because it is an unsaturated chain with the function of a carboxylic acid, but dimers and oligomers are still able to stop radical chain reactions. In addition, this carboxylic acid group also acts as an anchor of ferulic acid by which it binds to the lipid bilayer, providing protection against lipid peroxidation. In other words, the stable resonance structure of the methoxy radical is responsible to cease propagation of any chain reaction initiated by free radicals, making FA especially able to scavenge and stop free radical chain reactions (Kanski *et al.*, 2002; Graf, 1992).

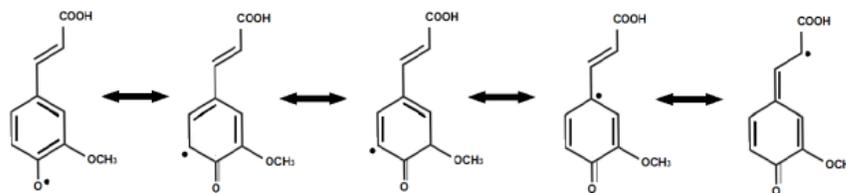


FIGURE 3 - Resonance stabilization mechanism of the FA radical

Pharmacological Applications

Antioxidant agent

Intestinal ischemia is a disease that occurs in the absence or reduction of arterial blood flow and/or bowel venous malformation by acute or chronic obstruction of the arteries and/or visceral veins. It may be caused by a thrombus, stenosis, derived (or not) from atherosclerosis, a trauma or vasospasm induced by vasoactive drugs (Simi, 2002). Among the various mechanisms that are involved in causing intestinal lesions that result from ischemia and subsequent reperfusion, the generation of ROS through the hypoxanthine/xanthine oxidase system is a major factor causing intestinal damage. The free radicals generated act mainly in peroxidation of cellular membranes, inactivation of enzymes disulfide bond dependents, inhibition of ATP synthesis through DNA changes and the formation of several oxygen-derived residues, which have great reducing potential (Horton & Walker, 1993; Schoenberg & Beger, 1993; Yoshida,

1996). In order to investigate the protective effects of FA in intestine injuries resulting from ischemia-reperfusion, Itagaki *et al.* (2009) conducted assays *in vivo* using male Wistar rats to compare the antioxidant activity of ferulic acid with ascorbic acid and epigallocatechin gallate (EGCG).

Ascorbic acid and EGCG are compounds with high activity for the elimination of superoxide anion and inhibition xanthine oxidase. Previous studies have demonstrated that EGCG inhibits the growth of tumors of the liver and intestine (Nishida *et al.*, 1994, Fujita *et al.*, 1989). In these studies it was found that EGCG and ascorbic acid have protective effects on intestinal ischaemia–reperfusion injury in the small intestine of rats. Although combined antioxidant activity from radical scavenging and xanthine oxidase inhibition of FA was much weaker than the combined antioxidant activities of EGCG and ascorbic acid, treatment with FA also prevented the increase in vascular permeability caused by intestinal ischaemia-reperfusion, suggesting that it can be used as an ingredient in functional foods to enhance the effect of other protective compounds.

Kawata *et al.* (2000) investigated the protective effects of FA on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane (AOM). In one experiment it was verified that the group receiving FA doses of 250 and 500 ppm presented a lower incidence of colon carcinomas (23 and 27 % respectively) compared to group that received only AOM (59%). In another experiment, it was found that the FA influenced the activities of glutathione S-transferase and quinone reductase in the liver and colon when utilizing doses of 25, 50 and 100 mg FA/kg body weight. The higher dose significantly increased activity of both enzymes, suggesting that their detoxifying activities are related to the effect of FA on colon carcinogenesis induced by AOM.

Intervertebral disc preservation agent

Intervertebral discs are pads of fibrocartilage which lie between the vertebral bodies of the spine and consists of central nucleus pulposus (NP) and outer annulus fibrosus composed of water, proteoglycans and collagen. It has been suggested that disc degenerative process is accelerated by catabolic factors such as pro-inflammatory mediators, matrix metalloproteinases and apoptotic factors (Walker & Anderson, 2004). Novel biological therapies for early stage of disc degeneration are currently under investigation to remove away the catabolic factors that

might recover the disc function to normal status (Yoon and Patel, 2006; Paesold *et al.*, 2007; Lotz *et al.*, 2012). Several studies have shown that reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide may play a role in disc degeneration. The high-level of ROS production are commonly resulted in apoptosis and senescence of the NP cells that associates with decreased number of NP cell and altered cell phenotype during disc degeneration (Gruber *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2009).

Cheng *et al.* (2011) elucidated the feasibility of use the thermosensitive Chitosan/Gelatin/Glycerol phosphate (G/C/GP) hydrogel as a controlled release system of FA for NP regeneration where the expression of ECM-related gene (type I collagen, type II collagen and aggrecan), catabolic gene (MMP-3), anti-catabolic gene (TIMP-1) and anabolic gene (TGF- β , BMP-7 and IGF-1) were selected to examine the effect of C/G/GP hydrogel containing FA on H₂O₂-induced oxidative stress NP cells. The study demonstrated that 500 μ m of FA-incorporated Chitosan/Gelatin/Glycerol Phosphate hydrogel could significantly decrease the oxidative stress induced by 100 μ m H₂O₂. From results of mRNA gene expression, FA-incorporated C/G/GP hydrogel could treat H₂O₂-induced oxidative stress NP cells through down-regulation of MMP-3 and up-regulation Aggrecan. In addition, FA-incorporated C/G/GP hydrogel could promote the desired ECM-related gene expression (type II collagen). The results of sulfated-GAGs to DNA ratio and alcian blue staining showed that the GAGs production of 100 μ m H₂O₂-induced oxidative stress NP cells could be increased to the normal level. The results of caspase-3 activity and TUNEL staining indicated that FA-incorporated C/G/GP hydrogel decreased the apoptosis of 100 μ m H₂O₂-induced oxidative stress NP cells.

More recently, Cheng *et al.* (2013) developed the thermosensitive FA covalently linked gelatin/chitosan/glycerol phosphate (FA-G/C/GP) hydrogel as a sustained release system of FA for NP regeneration. From the results of mRNA gene expression, FA-G/C/GP may treat H₂O₂-induced oxidative stress NP cells through down-regulation of MMP-3 and up-regulation Aggrecan and collagen-II. The sulfated-GAG production of 100 μ M H₂O₂-induced oxidative stress NP cells can be increased to the normal level in the post-treatment of FA-G/C/GP hydrogel group. The results of caspase-3 activity and TUNEL staining show that the apoptosis of NP cells caused by oxidative stress can be inhibited by post-treatment of FA-G/C/GP hydrogel.

These results suggest that thermosensitive C/G/GP hydrogel could be a suitable slow

release system for FA delivery and might be potentially applied as a long-term release system for NP regeneration in the near future.

Antimicrobial and anti-inflammatory agent

Studies performed *in vitro* of FA and ethyl ferulate (EF) activity on the HIV revealed that these compounds reduced the release and activity of the p24 antigen, an essential protein from virus capsid, after chronically infected cells were treated with 1, 5 and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of FA or EF. FA and FE at 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ inhibited the replication of the virus without cytotoxicity, suggesting that the FA and derivatives are potentially useful molecules for antiviral therapy (Edeas *et al.*, 1995).

FA also inhibits growth of both Gram-positive and negative bacteria, *Escherichia coli* and is already present in the composition of anti-inflammatory drugs used by Oriental Medicine (Jeong *et al.*, 2000).

Hirabayashi *et al.* (1995) investigated the effects of FA and isoferulic acid (IFA), active components of the rhizome of *Cimicifuga* species (plants used as anti-inflammatory agents in Japanese medicines), on murine interleukin-8 (IL-8) production in response to influenza virus infections *in vitro* and *in vivo* using the antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. IL-8 is a protein of the cytokine family which acts as a mediator in the inflammatory process which is also expressed in tumor cells. In the *in vitro* study, the murine macrophage cell line RAW 264.7 was infected with 10 PFU (plaque forming units) of influenza virus and cultured in the presence or absence of phenolic acids. Levels of IL-8 were reduced after 20 h in the conditioned medium when compared with the control, but the effect of IFA was greater than that of FA: IL-8 levels were reduced to 43% and 56% (compared with control) in the presence of 100 micrograms/ml of IFA and FA, respectively. In the *in vivo* study, mice were infected with 1 PFU of the virus and received daily oral administrations of the *Cimicifuga heracleifolia* extract (5 mg/mouse/day), FA (0.5 mg/mouse/day), IFA (0.125 mg/mouse/day), or phosphate buffered saline. All drugs presented a tendency to reduce IL-8 levels observed via bronchoalveolar lavage (BAL) two days after infection, and both acids significantly reduced the number of exuded neutrophils into BAL. The data indicates that these two compounds are the most active principles of the anti-inflammatory species obtained from *Cimicifuga*.

Hepatoprotective agent

The liver plays a key role in the detoxification and elimination of various harmful agents that can enter the organism through environmental or occupational exposure (Vander *et al.*, 1994). But it also can suffer damage from a variety of hepatotoxins, such as excessive alcohol intake, heavy metals, organic and inorganic solvents, resulting in excessive generation of free radicals which cause hepatotoxic lesions including acute hepatitis, cirrhosis, portal fibrosis and hepatic carcinoma (Vander *et al.*, 1994; Tolman & Serrine, 1998; Nakagiri *et al.*, 2003). Rukkumani *et al.* (2004) evaluated the hepatoprotective effect of FA on the toxicity induced by alcohol and poly-unsaturated fatty acids in female Wistar rats by administering (orally) ethanol, sunflower oil and 40 mg FA/kg of body weight per 45 days. The enzymes alkaline phosphatase, glutamyl transferase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase presented significantly decreased activities after treatment with FA. Enzymes with antioxidant activity, such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase presented significantly lower activity in rats receiving liver pure ethanol, pure sunflower oil and both. However, in the liver of rats given FA doses, the activities of these enzymes were increased and the reduction of oxidative stress was most significant in the lowest dose (20 mg FA/kg body weight). These positive results suggest that FA is a hepatoprotective agent against toxins commonly ingested in diet and it has the advantage of showing no side effects. Therefore it may be considered a potential molecule for alternative treatments of liver damage. Shanmugarajan *et al.* (2008) further evaluated the protective effects of FA on D-galactosamine, a hepatotoxin employed in studies involving liver disease, because it causes damage (necrosis) similar to the injury resultant of viral hepatitis in humans (Shi *et al.*, 2008). The results showed that the group of male Wistar rats that received pre-treatment (20 mg FA/kg body weight) had increased activity of antioxidant enzymes in liver tissue, significant inhibition of lipid peroxidation and decreased levels of cholesterol, triglycerides and free fatty acids in relation to the control group.

FA also has a hepatoprotective effect against toxicity induced *in vivo* by carbon tetrachloride, as reported by Srinivasan *et al.* (2005). Treatment with the acid significantly decreased the index of lipid peroxidation in the liver and significantly increased the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.

Yeh and Yen (2006) investigated the modulatory effects of FA in the *in vivo* system, where mice received a dose of 100 mg FA/kg body weight for 14 days. The activities of hepatic superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase were higher after administration of FA when compared with the control group ($P < 0.05$), and liver homogenates of rats treated with FA had a greater oxygen radical absorption capacity than the control group.

Kim *et al.* (2011) also investigated the hepatoprotective effect of FA against carbon tetrachloride (CCl_4)-induced acute liver injury. Mice were treated intraperitoneally with the vehicle or FA (20, 40, and 80 mg/kg) 1 h before and 2 h after CCl_4 injection (20 microliter/kg) and the serum was analyzed. Pretreatment with FA attenuated the increase of aminotransferase activities, the hepatic level of malondialdehyde, the serum level and mRNA expression of tumor necrosis factor- α , the levels of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 proteins, as well as mRNA expression. FA significantly attenuated the increase in levels of phosphorylated JNK and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase, and nuclear translocation of activated c-Jun. While acute CCl_4 challenge induced TLR4, TLR2, and TLR9 protein and mRNA expression, FA significantly inhibited TLR4 expression. This study provides evidence that FA may offer an alternative for prevention of acute liver diseases, because it prevents CCl_4 -induced hepatotoxicity by suppression of oxidative stress and inflammatory signaling pathways. These studies show that FA can also be used for protection and treatment of liver damage caused by drugs, viruses or metabolic disorders.

Ramar *et al.* (2012) investigated the effect of FA and resveratrol on alloxan-induced diabetic mice, through analysis of basic biochemical parameters, enzyme activities, lipid peroxidation and immunohistochemical studies. In this study FA was administered orally to alloxan-induced diabetic mice at the concentration of 10mg FA/kg body weight and 20mg resveratrol/kg body weight. The diabetic mice treated with FA and resveratrol exhibited smaller levels of lipid peroxidation, higher levels of antioxidants in the liver, kidney and serum, and a marked decrease in the immunoreactivity of the nuclear transcription factor (NF- κ B) compared to untreated diabetic mice. These results showed that FA and resveratrol exerted antioxidant and anti-diabetic effects, probably through inhibition of the proinflammatory factor and NF- κ B, reducing liver, kidney and pancreas damage caused by alloxan-induced diabetes.

Very recently, Panneerselvam *et al.* (2013) evaluated the protective effect of ferulic acid

(FA) on fluoride-induced oxidative hepatotoxicity in male Wistar rats. In the study, fluoride (25 mg/L) was given orally to induce hepatotoxicity for 12 weeks and hepatic damage were assessed using status of pathophysiological markers like serum marker enzymes (aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, gamma glutamyl transferase, lactate dehydrogenase, bilirubin and lipid profile), total protein content levels, and histopathological studies. Treatment with FA significantly reduced the degree of histological aberrations and rescued lipid peroxidation, as observed from reduced levels of lipid hydroperoxides, nitric oxide, restored levels of enzymic and non-enzymic antioxidants, and total protein content, with a concomitant decline in the levels of marker enzymes and lipid profile in fluoride-induced rats. These results suggest that ferulic acid has the ability to protect fluoride-induced hepatic damage.

Anti-diabetic agent

The metabolic disease Diabetes Mellitus (DM) which presents a multifactorial origin and increased oxidative stress has been indicated as playing a central role in these disorders (Reis *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2005). Evidence suggests that oxidative cell injury caused by free radicals contributes to the development of complications in type 1 diabetes (T1DM) and reduces enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses (Reis *et al.*, 2008).

In vivo studies have shown that the FA has the ability to neutralize free radicals present in the pancreas induced with streptozotocin. Female Wistar rats received 10 and 40 mg of FA/kg body weight for 45 days. The result was an increase in body weight of 61 % in the group given the lowest dose and 52 % in the group receiving the highest dose. Furthermore, blood glucose levels decreased 60 % in the high dose compared to the group of diabetic rats that did not receive FA. Activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were higher in the liver of the diabetic rats which received FA doses compared to the untreated diabetic group. This study shows that the elimination of free radicals facilitates the proliferation of β -cells that secrete insulin, which in turn will enhance the use of glucose by extra hepatic tissues, thus reducing the blood glucose levels (Balasubashini *et al.*, 2004).

Noumura *et al.* (2003) reported that the amides derived from FA also influence the increase in insulin secretion by pancreatic β -cells. Studies performed in rats have shown that

administration of the derivatives at a dose of 0.01% to 0.1% of the basal diet, decreased levels of glucose in diabetic rats induced by streptozotocin. In a study performed by Ohnishi *et al.* (2004) with KK-Ay mice, the dose of 0.05% FA effectively suppressed blood glucose levels and reduced lipid peroxidation in adipose tissue, indicating that FA can be useful in the reduction of oxidative stress and hyperglycemia in people suffering from DM. Subsequently, Jung *et al.* (2007) demonstrated in studies using diabetic mice that FA increases the activity of the enzyme glucokinase, a key enzyme in the regulation of blood glucose levels.

Adisakwattana *et al.* (2009) investigated the inhibitory activity of cinnamic acid derivatives against rat intestinal α -glucosidase and porcine pancreatic α -amylase *in vitro* in order to find effective inhibitors from natural sources, for use in the prevention and treatment of DM. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase delays the digestion of starch and disaccharides to absorbable monosaccharides, resulting in a reduction of postprandial hyperglycemia. Among the cinnamic acids tested, caffeic acid, FA and IFA were the most potent inhibitors against intestinal maltase, while IFA and FA were effective inhibitors of intestinal sucrase. However, all cinnamic acid derivatives were found to be inactive with respect to pancreatic α -amylase inhibition. Such studies are useful in developing treatments for diabetes as well as prevention.

Roy *et al.* (2013) investigate the protective effect of FA at different doses (50 mg/kg alternative day and 50 mg/kg daily) on diabetic rats and to explore the interrelationship between oxidative stress and cytokines correlates with apoptotic events in pancreatic tissue. Male Wistar rats were rendered diabetic by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg body weight) and FA was administered orally for 8 weeks. Treatment with ferulic acid to diabetic rats significantly improved blood glucose, serum total cholesterol, triglycerides, creatinine, urea, and albumin levels toward normal. Furthermore, decrement of the elevated lipid peroxidation levels and increment of the reduced superoxide dismutase, catalase, and reduced glutathione enzyme activities in pancreatic tissues were observed in ferulic acid-treated groups. Ferulic acid-treated rats in the diabetic group showed an improved histological appearance. The study also revealed a significant reduction in the activity of apoptosis using terminal dUTP nick end-labeling and reduced expression of TGF- β 1 and IL-1 β in the pancreatic β -cell of ferulic acid-treated rats. Treatment with ferulic acid daily doses produced a significant result compared to alternative dose. These results suggested that FA acts as a protective agent in diabetic rats by altering

oxidative stress, expression of pro-inflammatory cytokines and apoptosis.

Anti-cholesterolemic agent

Kim *et al.* (2003) showed that FA has the ability to reduce the level of low density lipoproteins in rats. It was suggested that synthesis of cholesterol was decreased by competitive inhibition of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) by FA. This enzyme is the most important regulatory step in the biosynthesis of cholesterol in the organism catalyzing the synthesis of mevalonic acid. In another *in vivo* study, conducted by Yogeeta *et al.* (2006), it was reported that pretreatment with FA at a dose of 20 mg/kg body weight and ascorbic acid at a dose of 80 mg/kg body weight in rats intoxicated with isoproterenol, significantly reduced levels of triglycerides, total cholesterol, cholesterol esters and free fatty acids in serum and heart tissues. Also observed was a decrease in the levels of phospholipids, lipid peroxides and low density lipoproteins. This study confirmed the action of two antioxidants in lipid metabolism and the synergistic effect between them.

Recently, Kwon *et al.* (2010) studied the anti-atherogenic effects of FA by administering 0.02 % FA (w/w) compared with clofibrate (0.02 %, w/w) in apolipoprotein E-deficient [apo E(-/-)] mice. Clofibrate reduces cholesterol and triglycerides in the blood. The results revealed that the concentrations of total cholesterol (total-C) and apolipoprotein B (apo B) in plasma and adipose tissue were significantly lower in the group that received FA or clofibrate and that there was no formation of fatty plaques in the aorta compared to the control group. The activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and paraoxonase) in the hepatocyte and erythrocyte were significantly higher in the FA group than in the control group, and the hepatic TBARS level was only slightly lower in the FA group. This study demonstrated that FA is as effective as clofibrate for reducing cholesterol and deserves attention due to its anti-atherogenic property in the apo E(-/-) mice fed with a Western diet.

Neuroprotective agent

Parkinson's disease (PA) and Alzheimer's disease (AD) are neurodegenerative diseases associated with chronic inflammation whose main responsible is oxidative stress by ROS and

reactive nitrogen species. These oxidative species affect activity of essential proteins, injure RNA and DNA, and induce lipid peroxidation resulting in neuronal dysfunction (Barnham *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2006). AD is characterized by neuronal loss, diffuse cortical atrophy, the presence of large numbers of senile plaques and neurofibrillary tangles, bead-vacuolar degeneration, neuronal loss, accumulation of β -amyloid proteins in senile plaques and disorders of the transmission of acetylcholine and acetyltransferases (Katzman, 1986; Mancuso *et al.*, 2007). The production of free radicals and neuroinflammation contribute to the destruction of some brain regions such as the cortex (Mancuso *et al.*, 2007). Thus, FA can have a favorable effect on AD, due to its anti-inflammatory and antioxidant properties (Graf, 1992; Kanski *et al.*, 2002).

Ono *et al.* (2005) evaluated the ability of FA to inhibit formation of β -amyloid fibrils (fA β) and the destabilization of existing fibrils when compared with the results obtained *in vitro* in previous studies with curcumin, rifampicin and tetracycline. Using fluorescence spectroscopic analysis with thioflavin T and electron microscopy, fA β at pH 7.5 and 37° C was analyzed. FA dose-dependently inhibited the formation of fA β and destabilized fA β s already formed. The activity of all the molecules examined was curcumin (a diferulate) > FA > rifampicin = tetracycline. Inhibition of fA β and destabilization of preformed fA β in the central nervous system are attractive therapeutic targets for the treatment of AD making FA an interesting molecule in the studies toward a development of a therapeutic treatment. In studies performed *in vivo* by Yan *et al.* (2001), mice were pretreated by ingesting water pure or containing ferulic acid (0.006 %). After 4 weeks, 410 pmol of β -amyloid peptide (A β 1-42) was administered via intracerebroventricular injection. Pretreatment with FA significantly reduced neuroinflammation, which was assessed using the glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a biochemical marker for gliosis and interleukin-1 β (IL-1 β) in the hippocampus, indicating that the prolonged delivery of FA induces resistance to toxicity caused by A β 1-42 in the brain and may be a useful chemopreventive agent against AD. Sultana *et al.* (2005) also found that ethyl-ferulate (eFA) has a protective effect against neurotoxicity induced by A β 1-42. In the pretreatment of primary hippocampal cultures with 10-50 mmol L⁻¹ eFA, cytotoxicity, intracellular accumulation of ROS, protein oxidation and lipid peroxidation induced by A β 1-42 were decreased. The study shows that the derivative of FA, eFA may be a key molecule in the therapeutic treatment of AD and other diseases related to oxidative stress.

Koh (2013) investigated whether ferulic acid can modulate the expression level of protein phosphatase 2A (PP2A) subunit B in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) animal model and glutamate toxicity-induced neuronal cell death. PP2A is an essential serine and threonine phosphatase protein which is involved in the regulation of several cellular functions including cell differentiation, apoptosis, and signal transduction and the reduction of PP2A causes central nervous system disorders such as Alzheimer's disease. PP2A is composed of a scaffolding subunit A, a variable regulatory subunit B, and a catalytic subunit C. It is accepted that the regulatory subunit B modulates various functions of PP2A and performs an essential role in the nervous system. The study showed that glutamate exposure induces a reduction of PP2A subunit B expression whereas ferulic acid prevents the glutamate-induced decrease in PP2A subunit B expression. The effect of ferulic acid appears to be dose-dependent. This study demonstrates that ferulic acid treatment modulates PP2A subunit B expression in neuronal cells injury using both in vivo and in vitro models.

The results support the hypothesis that the maintenance of PP2A subunit B by ferulic acid in ischemic brain injury ultimately leads to reduction of neuronal cell death and suggest that ferulic acid treatment reduces neuronal cell damage from ischemic brain injury by modulating PP2A subunit B expression.

Yan investigated the effects of ferulic acid in transgenic amyloid precursor protein (APP)^{swe}/presenilin 1 (PS1)^{dE9} (APP/PS1) mouse model of AD. Chronic (for 6 months from the age of 6 to 12 months) oral administration of ferulic acid at a dose of 5.3 mg/kg/day significantly enhanced the performance in novel-object recognition task, and reduced amyloid deposition and interleukin-1 beta (IL-1 β) levels in the frontal cortex. These results suggest that ferulic acid at a certain dosage could be useful for prevention and treatment of AD.

Anticarcinogenic agent

Reactive oxygen species are considered a significant class of carcinogens, participating in the initiation, progression and metastasis of neoplasm. ROS generated in the intracellular environment can directly produce alterations in simple or double stranded DNA, leading to mutagenesis (Ames, 1983). Large amounts of hydrogen peroxide are produced and secreted by tumor cells, confirming its importance in spread and invasion of the tumor (Szatrowski &

Nathan, 1991). Anti-cancer activity of FA is related to its antioxidant property to eliminate ROS and stimulate the activity of antioxidant enzymes (Hirose *et al.*, 1999).

Mori *et al.* (1999) studied the effects of FA on oral cancer after causing chemically induced carcinogenesis in rats using 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), exposing them for 5 weeks to drinking water containing with 0.02 g 4NQO/kg and after this period subjecting them to 0.5 g FA/kg body weight. It was found that the incidence of carcinomas in the tongue and preneoplastic lesions were significantly lower in the group receiving the dose of FA than the control group, suggesting that the FA possess chemopreventive activity against oral cancer. In another study by Kawabata *et al.* (2000) the effects of FA administered to the mice diets were examined after induced carcinogenesis in the colon by azoxymethane (AOM). After 35 weeks, the group that received doses of 0.25 and 5 g FA/kg body weight presented a lower incidence of colon carcinomas in relation to the group that received merely AOM. It was also observed that the enzymes responsible for detoxification of the liver and colon, glutathione S-transferase and quinone reductase, showed increased activities in mice treated with FA, suggesting these enzymes are directly related to the blocking effect caused by FA in carcinogenesis induced by AOM.

Alias *et al.* (2009) evaluated and compared the chemopreventive potential of topically applied and orally administered FA against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced skin carcinogenesis, estimating the status of phase I and phase II detoxication agents, lipid peroxidation byproducts and antioxidants. Skin squamous cell carcinoma was induced to the shaved back of mice, by painting with DMBA (25 µg in 0.1 mL acetone) twice weekly for 8 weeks. Oral administration of FA completely prevented the formation of skin tumors and reverted the status of phase I and phase II detoxication agents, lipid peroxidation byproducts and antioxidants to near-normal range in DMBA-treated mice. However, when topically applied, FA did not show significant chemopreventive activity during DMBA-induced skin carcinogenesis in the mice. The results demonstrate that orally administered FA has a potent suppressing effect on cell proliferation during DMBA-induced skin carcinogenesis, probably due to its modulating effect on the status of lipid peroxidation, antioxidants and detoxication agents during DMBA-induced skin carcinogenesis.

Another study using Sprague–Dawley rats evaluated the FA chemopreventive potential by

monitoring the incidence of tumors as well as analyzing phase II detoxification enzymes during mammary carcinogenesis induced by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA). Oral administration of FA at a dose of 40 mg/kg body weight prevented tumor formation in 80% (Baskaran *et al.*, 2010). Although there is no detailed mechanism of the process, the modulatory effect of FA on phase II detoxification cascade could play a possible role and it deserves attention due to its therapeutic potential in preventing mammary cancer.

Recently, Bandugula and Prasad (2013) studied the relevant mechanism of cell death induced by the combination of 2-Deoxy-d-glucose (2DG) and FA along with irradiation in NCI-H460 cells. Incubation of NCI-H460 cells with the combination of 2DG and FA for 24 h before irradiation upregulated the expression of proapoptotic proteins p53 and Bax. Combination of 2DG and FA also increased the levels of p21 and GADD45A in NCI-H460 cells. DNA repair inhibition is expected to be a possible mechanism for the radiosensitization observed, which is evidenced by the downregulation of radiation-induced ataxia-telangiectasia mutated gene expression upon treatment with 2DG and/or FA. Western blotting analysis of NF- κ B and caspase-3 revealed the involvement of apoptotic signals in the cytotoxicity exhibited by the combination of 2DG and FA. Cell cycle analysis data also showed the increased percentage of Sub-G0 phase cells upon treatment with the combination of 2DG and FA before irradiation. The results suggested that the cell death induced by the combination of 2DG and FA along with irradiation would involve alteration in expression of p53, p21, NF- κ B, Bax, and caspase-3, indicating oxidative mechanism in NCI-H460 cells.

UV protection agent

Saija *et al.* (2000) conducted *in vitro* and *in vivo* studies which proved the effectiveness of FA in combating skin damage caused by ultraviolet rays. They also showed that absorption of FA through the skin is not influenced by the pH of the lotion formulation, suggesting that FA can be used in the composition of lotions to combat photoaging. Murakami *et al.* 2002 demonstrated that a derivative from FA, FA15 (2-methyl-1-butyl ferulic acid) is also a chemopreventive agent. In tests performed *in vitro*, FA15 markedly suppressed the combined lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced protein expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2, and inhibited the release of tumor necrosis factor- α accompanied by

suppression of I-kappa B degradation in RAW264.7, a murine macrophage cell line. In tests conducted *in vivo* on mouse skin, topical application of FA15 caused a decrease in the production of hydrogen peroxide and edema formation caused by ultraviolet radiation while application of FA did not. These results suggest that FA15 is a novel chemopreventive agent, both structurally and functionally.

FA can be used as an additive in sunscreens available on the market to increase photoprotection of the skin, hair and combat premature and natural aging according to studies conducted by Lin *et al.* (2008). Pig skin was treated with five well-known isoflavone compounds (genistein, equol, daidzein, biochanin A, and formononetin) and one antioxidant combination solution of 15 % vitamin C, 1 % vitamin E and 0.5 % FA daily for 4 days. Skin was irradiated with solar-simulated UV irradiation, 1 to 5 minimal erythema dose (MED) at 1-MED intervals. Topical application of 0.5 % solutions of the three individual phytoestrogens – genistein, daidzein and biochanin A, showed less protection than that provided by the antioxidant mixture as measured by sunburn cell formation and/or erythema. With the objective of determining if a stable topical formulation of 15 % L-ascorbic acid, 1 % α -tocopherol, and 0.5% FA could protect human skin *in vivo* from substantial amounts of solar-simulated UV radiation, this mixture and its vehicle were applied to separate patches of normal-appearing human skin for 4 days. Each patch was irradiated with solar-simulated UV irradiation, 2 to 10 MED, at 2-MED intervals, and one day later the skin was evaluated for erythema and sunburn cells, as well as immunohistochemically for thymine dimers and p53. UV-induced cytokine formation and tumor necrosis factor- α were evaluated by real-time PCR. The results showed that the antioxidant mixture lotion provided significant photoprotection for skin according to all evaluation methods and its mechanism of action is different from sunscreens suggesting they can be used as a supplement to conventional sun protectors (Murray, *et al.* 2008).

Oresajo *et al.* (2008) evaluated the protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, FA and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin using biomarkers of skin damage. Ten subjects (18-60 years old; Fitzpatrick skin types II and III) were randomized and treated with the antioxidant product or vehicle control on the lower back for four consecutive days. On day 4, the two test sites received solar-simulated UV irradiation, and on day 5 digital images were taken and biopsies collected from the two test sites, as well as a

control site from each subject for morphology and immunohistochemical studies. Pretreatment of skin with the antioxidant composition limited the increase of the erythema, sunburn cell formation and p53 protein expression. As in the above mentioned case, this study confirmed the protective role of a unique mixture of antioxidants containing vitamin C, FA, and phloretin on human skin from the harmful effects of UV irradiation and can be proposed as sunscreen complement for providing photoprotection to human skin.

Radioprotective agent

Radioprotectors are antioxidants that have the ability to balance the free radicals produced by incidence of ionizing radiation offering some degree of protection for living tissues (Aruoma *et al.*, 1989). Today a number of radioprotective substances have been researched that reduce the negative effects caused by exposure to ionizing radiation. Even with a mechanism of action that has not yet been fully elucidated, several authors reported in the literature that its protective role is related to its chemical bonding with certain enzymes that are activated by these substances and free radicals (Malinda & Kleinman, 1996). The ranges of molecules that can act as radioprotectors, with the exception of synthetic substances, are commonly found in foods such as fruits, vegetables and meat (Aruoma *et al.*, 1989). Thus, FA can be included among potentially radioprotective molecules (Kanski *et al.*, 2002; Graf, 1992).

Srinivasan *et al.* (2006) evaluated the protective effects of FA in hepatocytes isolated from the liver of rats exposed to gamma radiation. Pretreatment of cells with 1, 5 and 10 mg FA/mL significantly decreased DNA damage, the generation of ROS and increased levels of antioxidant enzymes, suggesting that FA has potential for use in radiotherapy as a radioprotective agent.

Studies in rats have shown that intraperitoneal administration of 50, 75 and 100 mg FA/kg body weight 1 h before exposure to gamma radiation (4 Gy) found a decrease in yield of DNA strand breaks in murine peripheral blood leukocytes and bone marrow cells (Maurya *et al.*, 2006). The dose of 50 mg of FA/kg body weight resulted in faster disappearance of DNA strands breaks than the group of mice that received no FA. Janakiraman *et al.* (2012) repeated the same experiment supplying 50 mg FA/kg body weight once daily for five consecutive days. One hour after the last administration of FA on the sixth day, the whole body of the animals was exposed to

gamma radiation of 8 Gy and the effects of FA pretreatment on radiation-induced changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in spleen, liver and intestine were analyzed. Pretreatment with FA significantly increased activity of antioxidant enzymes including the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase at 24 h post irradiation. Using the comet assay, it was observed that FA pretreatment significantly decreased the percentage of tail DNA, tail length, tail moment and Olive tail moment in the peripheral blood of mice whose entire body was submitted to radiation. The histological observations indicated a decline in the villus height and crypt number with an increase in goblet and dead cell population in the irradiated group, which was normalized by FA pretreatment. These studies indicated that FA treatment prevents radiation-induced lipid peroxidation, DNA damage and restored antioxidant status and histopathological changes in experimental animals suggesting it can be adjuvant in radiotherapy to protect normal tissues from gamma-radiation damage.

Conclusions

Ferulic acid and some derivatives have proven to be effective antioxidant, anti-microbial, anti-inflammatory, hepatoprotective, neuroprotective, anticarcinogenic, anti-diabetic, anti-cholesterolemic, UV-protective and radioprotective. Most of the diverse pharmacological properties of FA might be associated with the ability of break free radical chain reactions, but not all. The positive effects of FA on HMG reductase, glucokinase and antioxidant and detoxication genes expression suggest additional properties whose mechanisms deserves further investigation. The noteworthy pharmacological properties of FA – wide array of therapeutic applications and lack of side effects known – make this compound a functional food as well as a substitute to synthetic drugs. However, the large number of *in vitro* and animal tests contrasts with the lack of clinical trials preventing the use of FA to human health both as a nutrient supplement, as well as a therapeutic drug against human diseases.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP and the Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory for financial support.

References

ADAM, A.; CRESPIY, V.; LEVRAT-VERNY, M. A.; LEENHARDT, F.; LEUILLET, M., DEMIGNE, C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J. of Nutrition.*, v.132, n.7, p.1962–1968, 2002.

ADISAKWATTANA, S.; CHANTARASINLAPIN, P.; THAMMARAT, H.; YIBCHOK-ANUN, S. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. *J. of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.24, n.5, p. 1194-1200, 2009.

ALIAS, L. M.; MANOHARAN, S.; VELLAICHAMY, L.; BALAKRISHNAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R. Protective effect of ferulic acid on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Exp. and Toxicol. Pathol.*, v.61, n.3, p. 205-214, 2009.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science.*, v. 221, n.4617, p. 1256-1264, 1983.

ARUOMA, O.T.; LAUGHTON, M. J.; HALLIWELL, B. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? *Biochem. J.*, v. 264, n.3, p.863-869, 1989.

BALASUBASHINI, M.S.; RUKKUMANI, R.; VISWANATHAN, P.; MENON, V.P. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytother. Res.*, v.18, n.4, p.310-314, 2004.

BANGULA, V. R.; PRASAD, N. R. 2-Deoxy-d-glucose and ferulic acid modulates radiation response signaling in non-small cell lung cancer cells. *Tumor Biology*, v. 34, n.1, p. 251-259, 2013.

BARNHAM, K.J.; CAPPAL, R.; Beyreuther, K.; Delineating common molecular mechanisms in Alzheimer's and prion diseases. *Trends Biochem. Sci.*, v.31, n.8, p. 465–472, 2006.

BASKARAN, N.; MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; PUGALENDHI, P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7, 12- dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague- Dawley rats. *Eur. J. Pharmacol.*, n.1-3, p. 22-29, 2010.

BENOIT, I.; NAVARRO, D.; MARNET, N.; RAKOTOMANOMANA, N.; LESAGE-

MEESEN, L.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHER, M.; ASTHER, M. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Res.*, v. 341, p.1820-1827, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOURNE, L.C; RICE-EVANS, C. Bioavailability of ferulic acid. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 253, n.2, p. 222–277, 1998.

CASTELLUCCIO, C.; PAGANGA, G.; MELIKIAN, N.; PRIDHAM, J.; SAMPSON, J.; RICE-EVANS C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.*, v.368, n.1, p.188-92, 1995.

CHANG, M. X.; XU, L.Y.; CHEN, J. S.; FENG, Y. Pharmacokinetic study of ferulic acid in rats. *J. Chinese Med. Mater.*, v. 18, p. 300–304, 1993.

CHENG, Y-H.; YANG, S-H.; LIN, F-H. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogel as a controlled release system of FA for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials*, v.32, n. 29, p. 6953-6961, 2011.

CHENG, Y-H.; YANG, S-H.; LIU, C-C.; GEFEN, A.; LIN, F-H. Thermosensitive hydrogel made of ferulic acid-gelatin and chitosan glycerophosphate. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, n. 2, p. 1512-1519, 2013.

CHOU DHURY, R.; SRAI, S.K.; DEBNAM, E.; RICE-EVANS,C.A. Urine excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, n. 3-4, p. 278–286, 1999.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates- nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, v.79, n.3, p. 362–372, 1999.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanita.*, v. 43, n.4, p. 348–361, 2007.

DE VRIES, R. P.; VAN KUYK, P. A.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J. The *Aspergillus niger* faeB gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation, and is specifically induced on aromatic compounds. *Biochem. J.*, v. 363, p. 377-386, 2002.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

Grasas y Aceites. Sevilla., v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

EDEAS, M.; KHALFOUN, Y.; LAZIZI, Y.; VERGNE, L.; LABIDALLE, S.; POSTAIRE, E.; LINDENBAUM, A. Effect of the liposolubility of free radical scavengers on the production of antigen P24 from a HIV infected monocytic cell line. *C R Seances Soc. Biol. Fil.*, v. 189, n.3, p. 367–373,1995.

FAULDS, C. B; BARTOLOMÉ, B; WILLIAMSON, G. Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Industrial Crops and Products.*, v.6, n.3-4, p. 367-374, 1997.

FAULDS, C. B.; RALET, M. C.; WILLIAMSON, G.; HAZLEWOOL, G. P.; GILBERT, H. J. Specificity of an esterase (XYLC) from *Pseudomonas fluorescens* subsp. Cellulose. *Biochim. Biophys Acta*, v. 1243, p. 265-269, 1995.

FAZARY, A. E.; JU, Y. H. Feruloyl Esterases as Biotechnological Tools: Current and Future Perspectives. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, v. 39, n.11, p.811–828, 2007.

FUJITA, Y.; YAMANE, T.; TANAKA, M.; KUWATA, K.; OKUZUMI, J.; TAKAHASHI, T.; FUJIKI, H.; OKUDA, T. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 80, n.6, p. 503-505, 1989.

FULCHER, R.G. Fluorescence microscopy of cereals in new frontiers in food microstructure. *Ed. American Association of cereal chemists.*, Ottawa, Canada, p. 167-175, 1983.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, v.13, n.4, p. 435-448, 1992.

GRUBER, H. E.; INGRAM, J. A.; NORTON, H. J.; HANLEY Jr, E. N. Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc: Immunolocalization of senescence-associated beta-galactosidase in human and sand rat discs. *Spine*, v. 32, p. 321-327, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HIRABAYASHI, T.; OCHIAI, H.; SAKAI, S.; NAKAJIMA, K.; TERASAWA, K. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in-vitro and in-vivo. *Planta Med.*, v. 61, n.3, p.221–226, 1995.

HIROSI, M.; TAKAHASHI, S.; OGAWA, K.; FUTAKUCHI, M.; SHIRAI, T. Phenolics:

blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Food. Chem. Toxicol.*, v. 37, n. 9-10, p. 985–992, 1999.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol Suppl.*, v. 20, p. 237–248, 1998.

HORTON, J.W.; WALKER, P.B. Oxygen Radicals lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.*, v. 74, n.4, p. 1515-1520, 1993.

IYAMA, K.; LAM, T.B.T.; Stone, B.A. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.*, v.104, n.2, p. 315–320, 1994.

ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; NAKATA, C.; SAITO, Y.; OIKAWA, S.; KOBAYASHI, M. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry.*, v.114, n.2, p. 466–471, 2009.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Nat. Cancer Inst.*, v. 70, n.2, p. 343–347, 1983.

JANAKIRAMAN, S.; ARUMUGAM, K.; REDDY, V. B.; NAGARAJAN, R. P. Ferulic acid, a dietary phenolic acid, modulates radiation effects in Swiss albino mice. *Eur. J. Pharmacol.*, Available online 26 June 2012, ISSN 0014-2999, 10.1016/j.ejphar.2012.06.027.

JEONG, Y.C.; JAE, H.M.; KEUN, H.P. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J. Food Sci. Technol.*, v.32, p. 1403–1408, 2000.

JOSHI, G.; PERLUIGI, M.; SULTANA, R.; AGRIPPINO, R.; CALABRESE, V.; BUTTERFIELD, D. A. *In vivo* protection of synaptosomes by FA ethylester from oxidative stress mediated by 2, 2-azo bis (2-amido-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe²⁺/H₂O₂: Insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Neurochemistry International.*, v.48, n.4, p. 318–327, 2006.

JUNG, E.H.; KIM, S.R.; HWANG, I.K.; HA, T. Y. Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 55, n.24, p.9800–9804, 2007.

KANSKI, J.; AKSENOVA, M.; STOYANOVA, A.; BUTTERFIELD, D.A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure activity studies. *J.Nutr. biochem.*, v. 13, n.5, p. 273-281, 2002.

KATZMAN, R. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, v.314, n.15, p. 964-973, 1986.

KAWABATA, K. YAMAMOTO, T.; HARA, A.; SHIMIZU, M.; YAMADA, Y.; MATSUNAGA, K.; TANAKA, T; KAYAHARA, H.; MIAO, Z.; FUJIWARA, G. Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer Res.*, v.19, n.5-A, p. 3763–3768, 1999.

KERN, S. M.; BENNETT, R. N.; NEEDS, P. W.; MELLON, F. A.; KROON, P. A.; GARCIA-CONESA, M. T. Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n.27, 2003.

KIM, H.K.; JEONG, T.S.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; CHOI, M.S. Lipid lowering efficacy of hesperidin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin. Chim. Acta.*, v. 327,n.1-2, p.129–137, 2003.

KIM, H.Y.; PARK, J.; LEE,K.H.; LEE, D.U.; JONG, H.K.; YEONG, S.K.; LEE, S.-M. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Toxicology*, v. 282, n.3, p.104–111, 2011.

KIM, K. W.; CHUNG, H. N.; HA, K.Y. LEE, J. S.; LIM. Y.Y. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *The Spine Journal*, v. 9 p. 658–666, 2009.

KOH, P-O. Ferulic Acid Attenuates the Injury-Induced Decrease of Protein Phosphatase 2A Subunit B in Ischemic Brain Injury. *PLoS ONE* 8 (1): e54217.doi:10.1371/journal.pone.0054217, 2013.

KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic acids are absorbed from rat stomach with different Absorption Rates. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n.20, p. 7539-7543, 2006.

KROON, P. A.; FAULDS, C. B.; RYDEN, P.; ROBERTSON, J. A.; WILLIAMSON, G. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, n.3, p. 661–667, 1997.

KROON,P.A.; GARCIA CONES, M.T.; FILLINGHAM, I. J; WILLIAMSON, G. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food*

Agric., v.79, n.3, p. 428-434, 1999.

KWON, E.; Y., DO.; G. M.; CHO, Y. Y.; PARK, Y. B.; JEON, S. M.; CHOI, M. S. Anti-atherogenic property of ferulic acid in apolipoprotein E deficient mice fed Western diet: Comparison with clofibrate. *Food Chem. Toxicol.*, v.48, n.8-9, p. 2298-3303, 2010.

LIN, J-K.; TOURNAS, J.A.; BURCH, J. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A., ZIELINSKI, J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v. 24, n.2, p. 61–66, 2008.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n.4, p.1256–1264, 2006.

LOTZ, J. C.; HAUGHTON, V.; BODEN, S. D.; AN, H. S.; KANG, J. D.; MASUDA, K.; FREEMONT, A.; BERVEN, S.; SEGUPTA, D. K.; TANEMBAUM, L.; MAURER, P.; RANGANATHAN., A.; ALAVI, A.; MARINELLI, N. L. New Treatments and Imaging Strategies in Degenerative Disease of the Intervertebral Disks. *Radiology*, v. 264, p. 6-19, 2012.

MALINDA, K. M.; KLEINMAN, H. K. The Laminins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.28, n.9, p.957-959, 1996.

MANCUSO,C.; SCAPAGINI,G.; CURRÒ D.; BUTTERFIELD, D.A.; CALABRESE,V. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci.*, v.12, p. 1107–1123, 2007.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J. Food Comp. Analysis.*, v. 20, n.3-4, p. 152–160, 2007.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J.; TORRONEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n.19, p. 7193–7199, 2006.

MATTILA, P.; PIHLAVA, J. M.; HELLSTROM, J. Contents of phenolic acids,alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n.21, p. 8290–8295, 2005.

MAURYA, D. K.; SALVI, V. P.; NAIR, C. K. Radiation protection of DNA by ferulic acid under *in vitro* and *in vivo* conditions. *J. Molecular and Cellular Biochem.*, v. 280, n.1-2, p. 209-217, 2005.

MORI, H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett .*, v. 157, n.1, p. 15–21, 2000.

MORI, H.; KAWABATA, K.; YOSHIMI, N.; TANAKA, T.; MURAKAMI, T.; OKADA, T.; MURAI, H. Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis. *Anticancer Res.*, v. 19, n.5A, p. 3775–3778, 1999.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; KOSHIMIZU, K.; TAKAHASHI, D.; MATSUMOTO, K.; HAGIHARA, K.; TANIGUCHI, H.; NOMURA, E.; HOSODA, A.; TSUNO, T.; MARUTA, Y.; KIM, H.W.; KAWABATA, K.; OHIGASHI, H. FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid. *Cancer Lett.*, v. 180, v.2, p.121–129, 2002.

MURRAY, J. C.; BURCH, J. A.; STREILEIN, R. D.; IANNACCHIONE, M. A.; HALL, R. P.; PINNELL, S. R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.59, n.3, p. 418-425, 2008.

NAKAGIRI, R.; HASHIZUME, E.; KAYAHASHI, S.; SAKAI, Y.; KAMIYA, T. Suppression by *Hydrangeae Dulcis Folium* of D-galactosamine-induced liver injury *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.67, n.12, p. 2641-2643, 2003.

NISHIDA, H.; OMORI, M.; FUKUTOMI, Y.; NINOMIYA, M.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; MORIWAKI, H.; MUTO, Y. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 85, n.3, p. 221-225, 1994.

NOUMURA, E.; KASHIWADA, A.; HOSODA, A.; NAKAMURA, K.; MORISHITA, H.; TSUNO, T.; TANIGUCHI, H. Synthesis of amide compounds of ferulic acid and their stimulatory effects on insulin secretion *in vitro*. *Bioorg.Med.Chem.*, v.11, n.17 p. 3807-3813, 2003.

OHNISHI, M.; MATUO, T.; TSUNO, T.; HOSODA, A.; NOMURA, E.; TANIGUCHI, H.; SASAKI, H.; MORISHITA, H. Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice. *Biofactors.*, v. 21, n.1-4, p. 315-319, 2004.

ONO, K.; HIROHATA, M.; YAMADA, M. Ferulic acid destabilizes preformed β -amyloid fibrils *in vitro*. *Biochem. Biophysic.Research Communications.*, v. 336, n.2, p. 444–449, 2005.

ORESANO, C.; STEPHENS, T.; HINO, P. D.; LAW, R. M.; YATSKAYER, M.; FOLTIS,

P.; PILLAI, S.; PINNELL, S.R. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. *J. Cosmet. Dermatol.*, v.7, n.4, p.290-297, 2008.

OSAWA, T.; NAMIKI, M.; KAWAKISHI, S. Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. *Basic Life Sci.*, v.52, p. 139-53, 1990.

PAESOLD, A. G.; NERLICH, N. BOSS, N. Biological treatment strategies for disc degeneration: Potentials and shortcomings. *European Spine Journal*, v.16, n.4, p. 447–468, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOUS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.*, v. 6, p.153-162, 2000.

PANNERSELVAM, L.; SUBBIAH, K.; ARUMUGAM, A.; SENAPATHY, J. G. Ferulic acid modulates fluoride-induced oxidative hepatotoxicity in male wistar rats. *Biological Trace Element Research*, v. 151, n.1, p. 85-91, 2013.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 100 p.

PISKULA, M. K.; TERAQ, J.; Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, v.128, n.7, p. 1172–1178, 1998.

POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metab. Dispos.*, v. 36, n.1, p.190–197, 2008.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, v.46, n. 7, p. 2686-2693, 1998.

RAMAR, M.; MANIKANDAN, B.; RAMAN, T.; PRIYADARSINI, A.; PALANISAMY, S.; VELAYUDAM, M.; MUNUSAMY, A.; MARIMUTHU PRABHU, N.; VASEEHARAN, B. Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 690, n.1-3, p.226-235, 2012.

RECHNER, A. R.; PANNALA, A. S.; RICE-EVANS, C. A. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids *in vivo*. *Free Radic Res.*, v. 35, n.2, p. 195–

202, 2001.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R.T.; PURISH, S.; MACHADO, J. A. N. Oxidative Stress: a Review on Metabolic Signaling in Type 1 Diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; BERSET, C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n.10, p. 3037–3041, 2002.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; FROMENTIN, G.; DURAND, P.; TOMÉ, D.; PROST, M.; BERSET, C. Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. *J. Agric Food Chem.*, v. 52, n.13, p. 4338–4343, 2004.

ROSAZZA, J. P. N.; HUANG, Z.; DOSTAL, L.; VOLM, T.; ROUSSEAU, B. Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J. Ind. Microbiol.*, v.15, n.6, p. 457–471, 1995.

ROY, S.; METYA, S. K.; SANNIGRAHI, S.; RAHAMAN, N.; AHMED, F. Treatment with ferulic acid to rats with streptozocin-induced diabetes: effects on oxidative stress, proinflammatory cytokines, and apoptosis in the pancreatic β cell. *Endocrine*: doi: 10.1007/s12020-012-9868-8, 2013.

RUKKUMANI, R.; ARUNA, K.; VARMA, P. S.; MENON, V. P. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *J. Physiology Pharmacol.*, v. 55, n.3, p.551-561, 2004.

RUMBOLD, K.; BIELY, P.; MASTIHUBOVA, M.; GUDEL, J.; GUBITZ, G.; ROBRA, K.H.; PRIOR, B. A. Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by *Aureobasidium pullulans*. *App. Environ. Microbiol.*, v.69, n.9, p. 5622-5626, 2003.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm*, v. 199, n.1, p.39–47, 2000.

SAKAI, S.; KAWAMATA, H.; KOGURE, T.; MANTANI, N.; TERASAWA, K.; UMATAKE MAND OCHIAI, H. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the

production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators Inflammation*, v.8, n.3, p. 173–175, 1999.

SÁNCHEZ, M.; QUEIJEIRO, E.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine Hypocotyls. Effect on peroxidase activities associated with cell walls. *Physiologia Plantarum.*, v.101, n.4, p. 815- 820, 1996.

SCHOENBERG, M.H.; BEGER, H.G. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med.*, v. 21, n.9, p. 1376-1386, 1993.

SHANMUGARAJAN, T. S.; KRISHNAKUMAR, E.; SOMASUNDARAM, I.; SIVARAMAN, D.; ARUNSUNDAR, M.; BALAJI, R.; SIVAKUMAR, S.M. Salutary Effect of Ferulic Acid Against D-Galactosamine Challenged Liver Damage. *J. Biol. Sci.*, v.8, n.8, p. 1271-1279, 2008.

SHARMA, P.; MISHRA, S.; AJMERA, P.; MATHUR, S. OXIDATIVE STRESS IN METABOLIC SYNDROME. *Indian J. Clinic. Biochem.*, v.20, n.1, p.145-149, 2005.

SHI, Y.; SUN, J.; HE, H.; GUO, H.; ZHANG, S. Hepatoprotective effects of Ganoderma lucidum peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacology.*, v. 117, n.3, p. 415-419, 2008.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *Europ. J. Biochem.*, v. 215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W.; Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.62, n.6, p. 1315-1321, 1995.

SILBERBERG, M.; MORAND, C.; MATHEVON, T.; BESSON, C.; MANACH, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur. J. Nutr.*, v. 45, n.2, p. 88–96, 2006.

SIMI, A.C. Isquemia intestinal. Maffei FHA. Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: MEDSI; p.123912-57, 2002.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.*, v. 15, n. 1, p.71-81, 2002.

SOOB RATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions.

Mutation Research, v. 579, n.1-2, p. 200–213, 2005.

SRINIVASAN, M.; RUKKUMANI, R.; RAM SUDHEER, A.; MENON, V.P. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride induced toxicity. *Fundamental & Clinical Pharmacology.*, v.19, n.4, p. 491–496, 2005.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; PILLAI, K. R.; KUMAR, P. R.; SUDHAKARAN, P. R.; MENON, V. P. Influence of ferulic acid on γ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Toxicology.*, v. 228, n.2-3, p.249-258, 2006.

SULTANA, R.; RAVAGNA, A.; MOHMMAD ABDUL, H.; CALABRESE, V.; BUTTERFIELD, D.A. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide (1-42) induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J.Neurochem.*, v.92, n.4, p. 749-758, 2005.

SZATROWSK, T. P.; NATHAN, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, v.51, n.3, p. 794-798, 1991.

TANIGUCHI, H.; HOSODA, A.; TSUNO, T.; MARUTA, Y.; NOMURA, E. Preparation of ferulic acid and its application for the synthesis of cancer chemopreventive agents. *Anticancer Res*, v.19, n.5A, p. 3757–3761, 1999.

TOLMAN, K.; SIRRINE, R. Drug-induced liver disease. Occupational hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease.*, v. 2, n. 3, p. 563-581, 1998.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. Nonimmune metabolism of foreign chemicals. *Human Physiology the Mechanisms of Body Function.*, p. 738-740, 1994.

WALKER, M. H.; ANDERSON, D. G. Molecular basis of intervertebral disc degeneration. *The Spine Journal*, v.4, p. 158–166, 2004.

WANG, S. Y.; LIN, H., S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WONG; D. S. W. FERULOYL ESTERASE: A key enzyme in biomass degradation. *Appl Biochem Biotechnol.*, v.133, n.2, p. 87-112, 2005.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, v.28, n.11, p.743-745, 1990.

YAN, J. J.; CHO, J. Y.; KIM, H. S.; JUNG, J. S.; HUH S, O.; SUH, H.W.; KIM, Y. H.; Song, D.K. Protection against beta amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.*, v.133, n.1, p. 89–96, 2001.

YAN, J. J.; JUNG, J. S.; KIM, T. K.; HASAN, A.; HONG, C. W.; NAM, J. S. SONG, D. K. Protective effects of ferulic acid in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Biol Pharm Bull*, v. 36, n.1, p. 140-143, 2013.

YEH, C. T.; YEN, G. C. Induction of Hepatic Antioxidant Enzymes by Phenolic Acids in Rats is Accompanied by Increased Levels of Multidrug Resistance–Associated Protein 3 mRNA Expression. *J. Nutri.*, v. 136, n.1, p. 11–15, 2006.

YOGEEETA, S. K.; HANUMANTRA, R. B.; GNANAPRAGASAM, A., SUBRAMANIAN, S.; RAJAKANNU, S.; DEVAKI, T. Attenuation of abnormalities in the lipid metabolism during experimental myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: beneficial effects of ferulic acid and ascorbic acid. *Basic & Clinical Pharm. & Toxicol.*, v. 98, n.5, p.467–472, 2006.

YOON, S.T.; PATEL, N. M. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Europ Spine J.*, v. 15, p. 379-388, 2006.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome de isquemia e reperfusão. *Cir. Vasc. Angiol.*, v.12, p.82-95. 1996.

ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Digestion and absorption of ferulic acid sugar esters in rat gastrointestinal tract. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n.18, p. 5534–5539, 2003.

ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *J. Nutr.*, v.134, n.11, p. 3083-3088, 2004.

ANEXO 2

Resumo do artigo referente ao Capítulo 2 da presente dissertação de mestrado publicado na revista **Applied Microbiology Biotechnology**

Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*

André R. L. Damásio · Cleiton Márcio Pinto Braga ·
Livia B. Brenelli · Ana Paula Citadini ·
Fernanda Mandelli · Junio Cota ·
Rodrigo Ferreira de Almeida · Victor Hugo Salvador ·
Douglas Antonio Alvaredo Paixao · Fernando Segato ·
Adriana Zerlotti Mercadante · Mario de Oliveira Neto ·
Wanderley Dantas do Santos · Fabio M. Squina

Received: 15 September 2012 / Revised: 22 October 2012 / Accepted: 23 October 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract The structural polysaccharides contained in plant cell walls have been pointed to as a promising renewable alternative to petroleum and natural gas. Ferulic acid is a ubiquitous component of plant polysaccharides, which is found in either monomeric or dimeric forms and is covalently linked to arabinosyl residues. Ferulic acid has several commercial applications in food and pharmaceutical industries. The study herein introduces a novel feruloyl esterase

from *Aspergillus clavatus* (AcFAE). Along with a comprehensive functional and biophysical characterization, the low-resolution structure of this enzyme was also determined by small-angle X-ray scattering. In addition, we described the production of phenolic compounds with antioxidant capacity from wheat arabinoxylan and sugarcane bagasse using AcFAE. The ability to specifically cleave ester linkages in hemicellulose is useful in several biotechnological applications, including improved accessibility to lignocellulosic enzymes for biofuel production.

André R. L. Damásio, Cleiton Márcio Pinto Braga, and Livia Brenelli contributed equally to this work.

A. R. L. Damásio · C. M. P. Braga · L. B. Brenelli · A. P. Citadini ·
F. Mandelli · J. Cota · R. F. de Almeida · D. A. A. Paixao ·
F. Segato · F. M. Squina (✉)
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
(CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
(CNPEM),
Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, no. 10.000, Caixa,
Postal 6170 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil
e-mail: fabio.squina@bioetanol.org.br

F. Mandelli · J. Cota · A. Z. Mercadante
Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia
de Alimentos, UNICAMP,
Campinas, São Paulo, Brazil

M. de Oliveira Neto
Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências,
UNESP,
Botucatu, São Paulo, Brazil

V. H. Salvador · W. D. do Santos
Departamento de Bioquímica, Centro do Ciências Biológicas,
UEM,
Maringá, Brazil

Keywords *Aspergillus clavatus* · Feruloyl esterase ·
Sugarcane bagasse · Wheat arabinoxylan · Phenolic
compounds · Antioxidant capacity

Introduction

The climate change due to the greenhouse gas emissions and other human activities has encouraged the quest for renewable means of fuel and chemical production (Chundawat et al. 2011). Lignocellulosic resources have the most favorable net energy ratio to maintain environmental sustainability. Therefore, the structural polysaccharides derived from plant cell walls have been pointed to as a promising renewable alternative to petroleum and natural gas (Crepin et al. 2003b).

Plant biomass saccharification and biofuel production are not a trivial process. The polysaccharide network in plant cell walls is one of the most complex structures in nature. The plant cell wall recalcitrance is highly influenced by ester cross-linked hydroxycinnamic acids, such as ferulic

ANEXO 3

Resumo do artigo referente ao Capítulo 3 da presente dissertação de mestrado publicado na revista **Bioresource Technology**



Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides

T.A. Gonçalves^{a,1}, A.R.L. Damásio^{a,1}, F. Segato^{a,1}, T.M. Alvarez^a, J. Bragatto^a, L.B. Brenelli^a, A.P.S. Citadini^a, M.T. Murakami^b, R. Ruller^a, A.F. Paes Leme^b, R.A. Prade^c, F.M. Squina^{a,*}

^a Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brazil

^b Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brazil

^c Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, OK, United States

HIGHLIGHTS

- ▶ Hypersecretion of xylanase and arabinofuranosidase by fungal expression system.
- ▶ Biochemical and biophysical characterization of both enzymes.
- ▶ Depiction of the mode of operation of both enzymes.
- ▶ Synergistic breakdown of wheat xylan and sugar cane bagasse.
- ▶ Enzymatic production of xylooligosaccharides from hemicellulosic feedstock.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2012

Received in revised form 10 May 2012

Accepted 11 May 2012

Available online 23 May 2012

Keywords:

Endo-xylanases

Arabinofuranosidases

Xylooligosaccharides

Hemicellulosic feedstock

Sugar cane bagasse

ABSTRACT

Plant cell wall degrading enzymes are key technological components in biomass bioconversion platforms for lignocellulosic materials transformation. Cost effective production of enzymes and identification of efficient degradation routes are two economic bottlenecks that currently limit the use of renewable feedstocks through an environmental friendly pathway. The present study describes the hypersecretion of an endo-xylanase (GH11) and an arabinofuranosidase (GH54) by a fungal expression system with potential biotechnological application, along with comprehensive characterization of both enzymes, including spectrometric analysis of thermal denaturation, biochemical characterization and mode of action description. The synergistic effect of these enzymes on natural substrates such as sugarcane bagasse, demonstrated the biotechnological potential of using GH11 and GH54 for production of probiotic xylooligosaccharides from plant biomass. Our findings shed light on enzymatic mechanisms for xylooligosaccharide production, as well as provide basis for further studies for the development of novel enzymatic routes for use in biomass-to-bioethanol applications.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lignocellulosic biomass has great potential as a renewable energy source and is considered the most promising feedstock for producing biofuels due to its versatility, availability and low cost. Biomass hydrolytic enzymes are key technological components for the efficient use of renewable feedstocks through an environmentally friendly bioconversion routes. Bottlenecks in this process include the cost effective production of enzymes and efficient deg-

radation of recalcitrant plant cell wall polymers into fermentable sugars (Pauly and Keegstra, 2008). Therefore, development of new routes for plant feedstock bioconversion into simple sugars, along with strategies for production of enzymes at high yield, are main foci in the biofuel research field.

Xylans can be broadly classified as homoxylans, arabinoxylans, glucuronoxylans, and arabinoglucuronoxylans (Polizeli et al., 2005). Arabinoxylans are the main hemicellulose forms in plant cell walls, especially in cereal grains such as wheat, and consist of a xylose backbone with arabinose residues linked to its O-2 or O-3 (Polizeli et al., 2005). One of the critically important enzymatic activities required to break down the xylan backbone are provided by endo-1,4- β -xylanases. These enzymes cleave the β -1,4 glycosidic linkage between xylose residues in the backbone. Xylanases have been classified into glycoside hydrolases (GH) families 5, 7, 8, 10, 11, and 43 on the basis of their amino acid sequences,

* Corresponding author. Address: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) Caixa Postal 6170, 13083-970, Campinas (SP), Brazil. Tel.: +55 19 3518 3111; fax: +55 19 35183104.

E-mail address: fabio.squina@bioetanol.org.br (F.M. Squina).

¹ These authors contributed equally to this work.

ANEXO 4

Cópia do documento do depósito de pedido de patente de inovação intitulado “Processo de produção de compostos fenólicos e sistema enzimático”.



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTEÇÃO DE MARCAS

18/01/2012

020120004553
15:39 NPRJ



BR 10 2012 001201 4

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE LUZ SINCROTRON - ABTLuS

1.2 Qualificação:

1.3 CNPJ/CPF: 015768170001-75

1.4 Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scoffaro, n° 10.000, Campinas, SP - BR

1.5 CEP: 13083-970

1.6 Telefone:

1.7 Fax:

1.8 E-mail:

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: PATENTE DE INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

"PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SISTEMA ENZIMÁTICO"

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N°

Data de Depósito:

5. Prioridade:

interna

unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: Fabio Marcelo Squina

6.2 Qualificação: Bacharel em Farmácia Bioquímica

6.3 CPF:

6.4 Endereço completo: Rua Giuseppe Máximo Scoffaro, 10.000 Guará Campinas SP BR

6.5 CEP: 13.083-970

6.6 Telefone:

6.7 Fax:

6.8 E-Mail:

continua em folha anexa



7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada. em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça): em anexo
(art. 12 da LPI e Item 2 do AN nº 127/97)

9. Procurador (74)

9.1 Nome: TAVARES PROPRIEDADE INTELECTUAL LTDA.

9.2 CNPJ/CPF: 42416453000143 9.3 APROAB: 817

9.4 Endereço completo: Av. Marechal Floriano, 45 6º andar, Centro - Rio de Janeiro

9.5 CEP: 20072-090 9.6 Telefone: (21)2263-3433 9.7 Fax: (21)2263-4568

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: 2 nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	9 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Anexo de Inventores, Razões e Declaração de Inventores.				3 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 19 fls.

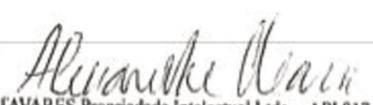
13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Rio de Janeiro, 18/01/2012 

Local e Data Assinatura e Carimbo

TAVARES Propriedade Intelectual Ltda. - API 817 RJ
Alexandre P. L. Maia

INPI Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 2/2)

ANEXO DE INVENTORES	
Título: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SISTEMA EN	
Página 1	
<p>Nome: André Ricardo de Lima Damasio Qualificação: Bacharel em Farmácia Industrial CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX: E-mail:</p>	
<p>Nome: Ana Paula da Silva Citadini Qualificação: Bacharel em Química Tecnológica CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX: E-mail:</p>	
<p>Nome: Cleiton Marcio Pinto Braga Qualificação: Bacharel em Biotecnologia CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX: E-mail:</p>	
<p>Nome: Livia Beatriz Brenelli de Paiva Qualificação: Bacharel em Química Tecnológica CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX: E-mail:</p>	
<p>Nome: Juliano Bragatto Qualificação: Bacharel e Licenciatura em Química CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX: E-mail:</p>	
<p>Nome: Fernando Segato Qualificação: Bacharel em Farmácia e Bioquímica CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX: E-mail:</p>	
<p>Nome: Wanderley Dantas dos Santos Qualificação: Bacharel em Biologia CPF: Endereço Completo: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 Guará Campinas SP BR CEP: 13.083-970 Telefone: FAX:</p>	 FAVARES Propriedade Intelectual Ltda. - API 817 RJ Alexandre P. L. Maia

**TITULAR: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE LUZ
SÍNCROTRON - ABTLuS
TÍTULO: "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
SISTEMA ENZIMÁTICO"**

Esclarecimento de Apresentação de Listagem de Sequência

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE LUZ SÍNCROTRON - ABTLuS, no pedido de patente em referência, vem apresentar a Listagem de Sequência e esclarece que a informação contida na "Listagem de Sequências" apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de nucleotídeos e aminoácidos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado.

A Requerente esclarece, adicionalmente, que a listagem de sequência está sendo apresentada em arquivo eletrônico (dois CDs), conforme resolução Nº228/2009, e declara que os arquivos eletrônicos contidos nos dois CDs ou DVDs são idênticos

Termos em que,
E. Deferimento.

Rio de Janeiro, 18 de janeiro de 2012.



TAVARES Propriedade Intelectual Ltda. - API 817 RJ
Alexandre P. L. Maia

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto:

Conversão enzimática do bagaço de cana de açúcar em ácido ferúlico e xilo-oligossacarídeos: moléculas com potencial aplicação na área farmacêutica e alimentos

Pesquisador responsável: Dr. Fabio Marcio Squina

Experimentador: Livia Beatriz Brenelli de Paiva

Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, [x]-mestrado, []-doutorado, []-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

As biotransformações se apresentam como ferramentas importantes para a renovação de recursos naturais em produtos com altos valores comerciais e são corretas do ponto de vista ambiental. O bagaço de cana que hoje é queimado nas usinas para produção de eletricidade, se empregada tecnologia adequada, pode vir a ser aproveitado no desenvolvimento de atividades mais nobres.

A dificuldade de conversão do bagaço de cana-de-açúcar e outros materiais lignocelulósicos em biocombustíveis, insumos químicos e outros compostos pode ser atribuída à morfologia da parede celular das plantas superiores. A parede celular é uma estrutura complexa composta por polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. O aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilo-oligossacarídeos, ácidos fenólicos e ácido ferúlico, biotecnologicamente, representa uma forma interessante de conversão de um subproduto da biomassa vegetal sem valor agregado em compostos com valor e requisitado para diversos fins nobres.

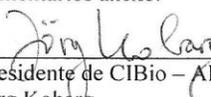
Os xilo-oligossacarídeos (XOS), derivados do arabinoxilano, são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose. Na indústria os XOS são obtidos através dos materiais lignocelulósicos, mas podem também serem obtidos de biomassa vegetal após tratamento enzimático com xilanases e FAEs. Demonstram um grande potencial de utilização em vários produtos, incluindo os farmacêuticos e na indústria de alimentos. A utilização de XOS como ingredientes para alimentos funcionais é fundamentada nos seus benefícios a fisiologia da microflora intestinal. Oferecem vantagens, se comparados com os outros oligossacarídeos em termos de estabilidade e efeitos à saúde, como o estímulo ao crescimento de probióticos como o *Lactobacillus spp.*, juntamente à inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, promovendo uma série de benefícios ao sistema digestivo e imunológico.

O ácido ferúlico é um polifenol presente em abundância no reino vegetal que apresenta uma ampla gama de efeitos terapêuticos no tratamento contra o câncer, diabete, doenças pulmonares e cardiovasculares, hepato, neuro e radioprotetores, atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Esse potencial pode ser atribuído a sua potente capacidade antioxidante.

O projeto de mestrado tem como objetivo otimizar a produção de xilanases e feruloil esterases (FAE) por organismos recombinantes, caracterizar o modo de operação e a especificidade por substratos das duas enzimas consideradas chaves no processo, estabelecer combinações de enzimas e substratos para avaliar a produção de ácido ferúlico, outros ácidos fenólicos e oligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar, desenvolver protocolos para liberação de ácido ferúlico e xilo-oligossacarídeos a partir de bagaço de cana e ainda avaliar a capacidade antioxidante dos produtos liberados da hidrólise destas enzimas sobre o bagaço de cana.

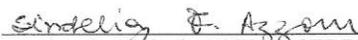
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 15.2.12.

Parecer final: [x]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários anexo.

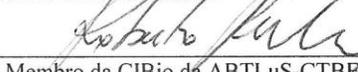

Presidente de CIBio – ABTLuS-LNBio
Jörg Kobarg

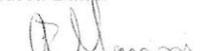

Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Fabio Squina


Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Sindelia Freitas Azzoni


Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Andrea Balan


Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Roberto Ruller


Membro da CIBio – ABTLuS-SGT
Carolina Barbosa Marini