

CAMILA MORAIS GONÇALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE  
BEBIDAS CONTENDO POLIFENÓIS  
BIOTRANSFORMADOS

Bragança Paulista

2011

CAMILA MORAIS GONÇALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE  
BEBIDAS CONTENDO POLIFENÓIS  
BIOTRANSFORMADOS

ORIENTADORA

PROFA. DRA. PATRÍCIA DE OLIVEIRA CARVALHO

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação *Stricto Sensu*  
em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco para  
a obtenção do título de Mestre.

Bragança Paulista

2011

QV 325  
S579a

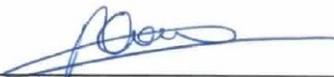
Silva, Camila Morais Gonçalves da.  
Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de bebidas contendo polifenóis biotransformados / Camila Morais Gonçalves da Silva. -- Bragança Paulista, 2011.  
88 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.  
Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Chá mate. 2. Chá verde. 3. Laranja. 4. Limão.  
4. Hesperidinase 5. Naringinase. 6. Glicosidase.  
7.  $\beta$ -Galactosidase. 8. Atividade antioxidante.  
I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

SILVA, Camila Morais Gonçalves da. "**Avaliação da atividade antioxidante in vitro de bebidas contendo polifenóis biotransformados**" Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e dois de Junho de 2011 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



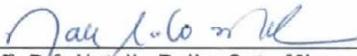
---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho  
Universidade São Francisco



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Michelle Darrieux Sampaio Bertocini  
Universidade São Francisco



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Natalia Reiko Sato Miyasaka  
Universidade São Francisco

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho às pessoas  
mais importantes da minha vida,  
aos meus pais: Dionísio e Eliana,  
e ao meu marido, Mário.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus e à Nossa Senhora das Graças por toda a proteção sempre oferecida a mim e a minha família.

Agradeço aos meus pais e ao meu marido pelo apoio, pelo amor incondicional, pelas orações, por acreditarem em mim e pela torcida.

Agradeço também ao carinho do meu irmão, dos meus sogros e da minha sobrinha.

Muito obrigada aos meus amigos, que sempre torceram por mim, em especial a Viviane e aos meus queridos alunos de iniciação científica: Ariana, Michele e Leandro. O meu muito obrigado também aos meus alunos de IC do projeto em parceria com o professor Martinez: Fernando, Marcos, Rodrigo, Fábio, Thaís e Letícia.

Agradeço também à minha orientadora Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, pelo apoio e pelas orientações e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço ainda aos colegas e técnicos de laboratório (em especial à Alline, Bel, Verônica e Jani) e a Vilma (PG) pela paciência e pelos momentos divertidos.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à Universidade São Francisco - USF, à Universidade Estadual de Campinas – Unicamp (Instituto de Química e Departamentos de Bioquímica e Biologia Vegetal) e ao professor Dr. Carlos Augusto Real Martinez, pelas boas risadas, pela parceria, por acreditar no meu trabalho e pela amizade.

## **Epígrafe**

“Tudo tem seu tempo e até certas  
manifestações mais vigorosas  
e originais entram em voga ou saem de moda.  
Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.”

Baltasar Gracián

## RESUMO

Os flavonóides têm sido objeto de inúmeras comprovações de suas propriedades funcionais, em especial relativas às suas propriedades antioxidantes. É conhecido que estes compostos apresentam estruturas diversas, podendo ser encontrados na forma de ésteres, polímeros e principalmente de glicosídeos, os quais, apesar de abundantes, nem sempre são bem absorvidos na sua forma nativa, o que pode reduzir ou retardar seus benefícios. No presente trabalho, foram estudados processos enzimáticos de biotransformação dos flavonóides glicosilados do chá mate (*Ilex paraguariensis*), chá verde (*Camellia sinensis*) e dos sucos de laranja (*Citrus sinensis*) e limão (*Citrus aurantifolia*) visando à obtenção de derivados funcionais com maior capacidade antioxidante. As reações enzimáticas foram realizadas em condições controladas de processo, utilizando enzimas comerciais (hesperidinase de *Penicillium* sp, naringinase de *Penicillium decubens*, glicosidase de *Aspergillus niger* e  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*). As melhores condições de reação de hidrólise foram determinadas, obtendo-se faixa de pH ótimo de 3,8 a 4,5 e temperatura ótima de 30°C a 40°C. A atividade antioxidante foi avaliada por testes *in vitro* antes e após as reações de biotransformação, utilizando diferentes ensaios: FRAP, DPPH,  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico e ORAC; a avaliação da lipoperoxidação foi realizada pelo índice de TBARS, utilizando gema de ovo como fonte de lipídios. Os teores de polifenóis totais e de flavonóides foram quantificados por espectrofotometria, enquanto o perfil da composição destes compostos nas amostras foi caracterizado por espectrometria de massas (ESI-MS). As amostras com maior teor de polifenóis foram os chás (verde > mate) e em seguida os sucos (laranja > limão). A atividade antioxidante de todas as amostras mostrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após as reações de biotransformação, com destaque para as amostras de suco de laranja e limão, que praticamente duplicaram a atividade antioxidante quando avaliados pelo ensaio ORAC. O ensaio ORAC avaliou também flavonóides padrões e, conforme esperado, os menos complexos ou agliconas apresentaram maior potencial antioxidante. A associação enzimática em um mesmo processo não foi efetiva em elevar a capacidade antioxidante. Os espectros de massas confirmaram a atuação das enzimas na hidrólise das frações glicosídicas dos flavonóides, em especial da rutina, hesperidina e do kaempferol glicosilado, gerando compostos de interesse com maior capacidade antioxidante. **Palavras-chave:** chá mate, chá verde, laranja, limão, hesperidinase, naringinase, glicosidase,  $\beta$ -galactosidase, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Flavonoids have been subject of much evidence of their functional properties, especially concerning their antioxidant properties. It is known that these compounds have diverse structures and can be found in the form of esters, polymers and mainly glycosides, which although abundants, are not always well absorbed in their native form, which can reduce or delay their benefits. In this work we studied the flavonoid biotransformation processes of mate tea (*Ilex paraguariensis*), green tea (*Camellia sinesis*), orange juice (*Citrus sinensis*) and lemon juice (*Citrus aurantifolia*) using microbial enzymes to obtain derivatives with higher antioxidant capacity. The enzymatic reactions were performed in a controlled process using commercial enzymes (hesperidinase from *Penicillium* sp, naringinase from *Penicillium decubens*, glucosidase from *Aspergillus niger* and  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*). The best reaction conditions for hydrolysis were determined, and optimum pH from 3.8 to 4.5 and optimum temperature 30°C to 40°C were obtained in this enzymatic reaction. Antioxidant activities were evaluated by *in vitro* tests before and after the biotransformation reactions, using different methods: FRAP, DPPH,  $\beta$ -carotene, ORAC and evaluation of lipid peroxidation (egg yolk) using the TBARS index. The total polyphenols and flavonoids were quantified by spectrophotometry while the composition profile of these compounds in the samples was performed by mass spectrometry (ESI-MS). Samples with higher polyphenol content were teas (green > mate) followed by juices (orange > lemon). The antioxidant activity of all samples showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) after the biotransformation reactions. The biotransformation processes with orange and lemon juices doubled the antioxidant activity, as assessed by ORAC assay. The flavonoids patterns were also assessed by ORAC assay, and as expected, the least complex or aglycones showed higher antioxidant potential. The enzymatic association in the same process was not effective in increasing the antioxidant capacity of samples. The mass spectra of the samples confirmed the action of enzymes in hydrolysis of glycosidic fractions of flavonoids, especially rutin, hesperidin and kaempferol glycoside, generating simpler products of higher antioxidant capacity. **Key words:** mate tea, green tea, orange, lemon, hesperidinase, naringinase, glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, antioxidant activity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aam	absorbância das amostras
AAPH	2,2-azobis amidinopropano
Ac	absorbância da amostra controle
ASC	área sob a curva
Brix	escala numérica de medida da quantidade de sólidos solúveis em solução de sacarose
CBG	$\beta$ -glicosidase citosólica
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
$\bar{e}$	elétron
EC	epicatequina
ECG	epicatequina galato
EGC	epigalocatequina
EGCG	epigalocatequina galato
ESI	espectrômetro de massas por spray
Fe	ferro
Folin <sup>®</sup>	solução de molibdato, tungstato e ácido fosfórico
FRAP	potencial antioxidante de redução do ferro
Ga	$\beta$ -galactosidase
Glu/Gli/G	glicosidase
H	hesperidinase
iNOS	sintase de óxido nítrico
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPH	lactase-florizina-hidrolase
LPO	lipoperoxidação
MDA	malondialdeído
Me	metil
MS	espectrometria de massas
<i>m/z</i>	relação massa/carga

N	naringinase
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nh	neohesperidosídeo
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
ORAC	capacidade de absorvância do radical oxigênio
Ram	ramnose
rpm	rotação por minuto
Ru	rutinosídeo
SGLT	transportador ativo de glicose
SN 1	solução de sulfato de cobre cristalino em água
SN 2	solução de tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio
SRL	seqüestro de radicais livres
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TE	trolox equivalente
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral- $\alpha$
TPTZ	2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium
Trolox <sup>®</sup>	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
u	unidade de massa atômica
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
% I	inibição da oxidação

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Principais flavonóides glicosilados encontrados nos alimentos.
- Tabela 2 Propriedades farmacológicas dos chás mate, verde e sucos de laranja e limão.
- Tabela 3 Composição polifenólica da *Ilex paraguariensis*.
- Tabela 4 Composição polifenólica da *Camellia sinensis*.
- Tabela 5 Teaflavinas formadas a partir dos pares de catequinas.
- Tabela 6 Concentração de hesperidina nos sucos de laranja brasileiros.
- Tabela 7 Composição polifenólica da *Citrus sinensis* mg/100 mL.
- Tabela 8 Composição polifenólica da *Citrus aurantifolia* mg/100 mL.
- Tabela 9 Proposta de atuação enzimática sobre os possíveis polifenóis encontrados nas matrizes alimentares estudadas.
- Tabela 10 Condições de reação para a determinação da atividade enzimática de hidrólise dos flavonóides glicosilados pelas enzimas hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase.
- Tabela 11 Condições de reação para determinação da temperatura ótima.
- Tabela 12 Condições de reação para determinação do pH ótimo.
- Tabela 13 Diferentes condições de reação (concentração de enzima, pH e temperatura) adotadas para as reações de biotransformação.
- Tabela 14 Atividade enzimática de hidrólise dos flavonóides glicosilados.
- Tabela 15 Polifenóis e flavonóides totais das amostras de chá mate, verde e sucos de laranja e limão antes da reação de biotransformação.
- Tabela 16 Índice de TBARS (mg) por grama das amostras de chá mate, verde e sucos de laranja e limão liofilizados e reconstituídos com água.
- Tabela 17 Ensaio ORAC para as amostras de chás mate e verde e sucos de laranja e limão *in natura* e biotransformados enzimaticamente.
- Tabela 18 Ensaio ORAC para os padrões dos flavonóides G-hesperidina, hesperidina, rutina e quercetina.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura geral e padrão de numeração dos flavonóides.
- Figura 2 Estrutura dos flavonóides, na forma aglicona, das principais classes encontradas nos alimentos.
- Figura 3 Grupos responsáveis pela atividade antioxidante na molécula dos flavonóides.
- Figura 4 Trânsito e metabolização dos flavonóides no organismo.
- Figura 5 Etapas da hidrólise da hesperidina pela hesperidinase.
- Figura 6 Etapas da hidrólise da naringina pelo complexo naringinase.
- Figura 7 Hidrólise dos flavonóides glicosilados pela enzima glicosidase.
- Figura 8 Etapa da hidrólise da molécula de kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo em kaempferol aglicona.
- Figura 9 Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da hesperidinase na hidrólise do substrato rutina.
- Figura 10 Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da naringinase na hidrólise do substrato rutina.
- Figura 11 Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da glicosidase na hidrólise do substrato rutina.
- Figura 12 Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise do substrato kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.
- Figura 13 Efeito do pH da reação na atividade enzimática da hesperidinase na hidrólise do substrato rutina.
- Figura 14 Efeito do pH da reação na atividade enzimática da naringinase na hidrólise do substrato rutina.
- Figura 15 Efeito do pH da reação na atividade enzimática da glicosidase na hidrólise do substrato rutina.
- Figura 16 Efeito do pH da reação na atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise do substrato kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.
- Figura 17 Capacidade antioxidante do chá mate antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu$ M de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%).

- Figura 18 Capacidade antioxidante do chá verde antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%).
- Figura 19 Capacidade antioxidante do suco de laranja antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%).
- Figura 20 Capacidade antioxidante do suco de limão antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%).
- Figura 21 Composição do chá mate antes da biotransformação (A) e do chá mate biotransformado por hesperidinase e  $\beta$ -galactosidase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).
- Figura 22 Composição do chá verde antes da biotransformação (A) e do chá verde biotransformado por  $\beta$ -galactosidase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).
- Figura 23 Composição do suco de laranja antes da biotransformação (A) e do suco de laranja biotransformado por hesperidinase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).
- Figura 24 Composição do suco de limão antes da biotransformação (A) e do suco de limão biotransformado por hesperidinase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).
- Figura 25 Perfil (ESI(-)-MS/MS) do íon de  $m/z$  609 (rutina padrão) gerando  $m/z$  301 (quercetina).
- Figura 26 Perfil (ESI(-)-MS/MS) do íon de  $m/z$  609 (hesperidina padrão) gerando  $m/z$  463 (após retirada da ramnose  $m/z$  146) e  $m/z$  301 (hesperetina, após a retirada da glicose  $m/z$  162).

## SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Polifenóis	1
1.2	Flavonóides	2
1.2.1	Estrutura e classificação	2
1.2.2	Flavonóides: relação estrutura/atividade antioxidante	7
1.2.3	Biodisponibilidade dos flavonóides: influência da glicosilação na atividade antioxidante	9
1.2.4	O consumo dos flavonóides	12
1.2.5	As propriedades farmacológicas dos flavonóides	12
1.2.6	Os flavonóides do chá mate	15
1.2.7	Os flavonóides do chá verde	17
1.2.8	Os flavonóides dos sucos cítricos	19
1.3	Biotransformação de polifenóis	22
1.3.1	Enzimas para hidrólise dos flavonóides glicosilados	24
1.3.1.1	Ramnosidase	24
1.3.1.2	Glicosidase	26
1.3.1.3	$\beta$ -galactosidase	27
1.3.1.4	Atuação enzimática nos polifenóis das matrizes alimentares estudadas	28
1.4	Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante	31
2	Objetivo	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	Materiais e métodos	34
3.1	Substratos e formas de preparo	34
3.2	Enzimas	34
3.3	Reagentes	34
3.4	Equipamentos	35
3.5	Determinação da atividade enzimática na hidrólise de flavonóides glicosilados	35

3.6	Determinação das condições ótimas para a atuação enzimática	36
3.7	Reação de biotransformação utilizando as matrizes alimentares	38
3.8	Extração dos flavonóides totais	39
3.9	Avaliação da capacidade antioxidante	40
3.9.1	Método de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	40
3.9.2	Método do poder antioxidante de redução do ferro – “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP)	41
3.9.3	Método de seqüestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	41
3.9.4	Método de oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico	42
3.9.5	Método da capacidade de absorção de radicais oxigênio – “Oxygen Radical Absorbance Capacity” (ORAC)	43
3.10	Quantificação dos compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu	44
3.11	Quantificação dos flavonóides totais	44
3.12	Caracterização química das amostras por espectrometria de massas	45
3.13	Análise estatística	45
4	Resultados e Discussão	46
4.1	Atividade enzimática na hidrólise de flavonóides glicosilados	46
4.2	Efeito da temperatura na atividade das enzimas	47
4.3	Efeito do pH na atividade das enzimas	49
4.4	Caracterização das amostras	51
4.4.1	Quantificação dos polifenóis e flavonóides totais	51
4.4.2	Capacidade antioxidante	52
4.4.2.1	Medida da peroxidação lipídica pelo índice de TBARS	52
4.5	Influência da biotransformação na capacidade antioxidante das amostras	53
4.6	Caracterização química das amostras antes e após a biotransformação	64
5	Conclusão	74
6	Referências Bibliográficas	75
7	Anexos	86

## 1 - INTRODUÇÃO

Bebidas largamente consumidas no Brasil e ricas em flavonóides, um dos tipos de polifenol, tais como o chá mate (*Ilex paraguariensis*), o chá verde (*Camellia sinensis*) e os sucos de laranja e limão (*Citrus sinensis* e *Citrus aurantifolia*) têm sido objeto de estudo devido às suas propriedades funcionais.

Estudos clínicos e em modelos animais indicam que os polifenóis exercem efeitos benéficos devido principalmente às suas propriedades antioxidantes (Holst & Williamson, 2008). Além dessa propriedade, que é uma das mais enfatizadas na literatura, esses compostos são também responsáveis por outras atividades conhecidas como: antimutagênica, anticarcinogênica, antiinflamatória e pela prevenção de doenças cardiovasculares (Cao & Ito, 2004; Coutinho *et al.*, 2009).

Por outro lado, os polifenóis, em especial aqueles encontrados na forma de ésteres, glicosídeos e polímeros, apesar de abundantes nos alimentos, nem sempre são bem absorvidos após a ingestão oral. Ou seja, o efeito funcional esperado não depende somente da quantidade ingerida, mas também de características moleculares que podem influenciar na biodisponibilidade do composto (Holst & Williamson, 2008).

A desglicosilação das moléculas dos polifenóis representa boa alternativa para o aumento da atividade antioxidante desses compostos (Park *et al.*, 2006a), além de elevar a biodisponibilidade ao favorecer a interação de moléculas mais lipossolúveis com as membranas celulares, o que facilita a absorção (Nilsen *et al.*, 2006; Salem *et al.*, 2010).

Dessa forma as enzimas hesperidinaase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase foram utilizadas no estudo com o intuito de hidrolisar a fração glicosídica dos polifenóis e elevar a atividade antioxidante das matrizes alimentares estudadas, o que justificaria ainda mais a utilização dessas bebidas brasileiras, como alimentos funcionais, na dieta da população.

### 1.1 - Polifenóis

Polifenol pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilas e/ou seus derivados funcionais como ésteres, metoxilas, glicosídeos dentre outros. Refere-se a um amplo e numeroso grupo de moléculas

encontradas em chás, frutas, hortaliças, cereais, café, cacau, vinho, sucos de frutas e soja (Escarpa & Gonzales, 2001).

Nas plantas, os polifenóis exercem a função de fotoproteção, defesa contra os microrganismos e insetos, além de serem responsáveis pela pigmentação e por algumas características organolépticas dos alimentos (Escarpa & Gonzales, 2001).

As diversas classes polifenólicas se diferenciam pela estrutura (quantidade e distribuição dos átomos de carbono) e pela massa molecular, sendo que os flavonóides são os representantes de uma das classes polifenólicas e possuem importantes propriedades funcionais (Escarpa & Gonzales, 2001).

## **1.2 - Flavonóides**

### **1.2.1 - Estrutura e classificação**

Entre as diversas classes que compõem os compostos polifenólicos, os flavonóides são considerados muito importantes para a alimentação humana, devido a sua ampla distribuição em frutas, hortaliças e legumes, além dos grãos, cereais e leguminosas. A sua biossíntese é estimulada pela luz; desta forma, eles se acumulam nos tecidos aéreos (Archivio *et al.*, 2007). Os flavonóides são substâncias que tem habilidade para prevenir doenças (González-Gallego, 2010), pois possuem propriedades antioxidantes (Majchrzak *et al.*, 2004).

A estrutura dos flavonóides (Figura 1) está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis. O benzeno do anel A é condensado com o sexto carbono do anel C, que na posição dois carrega um grupo fenila como substituinte. Os dois anéis benzênicos são unidos por um anel heterocíclico (Aherne & O'Brien, 2002).

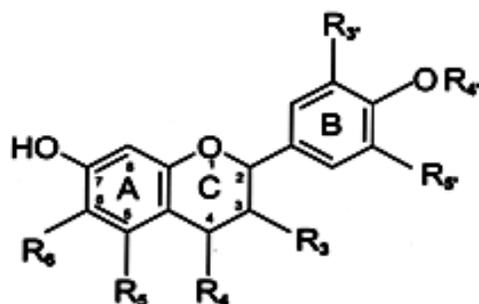


Figura 1 - Estrutura geral e padrão de numeração dos flavonóides. As ligações, posições de insaturações e grupos funcionais são específicos para cada classe de flavonóides (A = 1° anel, B = 2° anel e C = 3° anel) (Birt *et al.*, 2001).

Os flavonóides podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990 (Birt *et al.*, 2001). Esta classificação depende da oxidação do anel central (pirano) e dos substituintes (Março *et al.*, 2008).

As principais classes encontradas nos alimentos são:

**-Flavanóis** (catequina): contém apenas a hidroxila no carbono-3, porém sem a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel C;

**-Flavonóis** (quercetina, kaempferol e miricetina): contém uma hidroxila na posição três e carbonila na posição quatro do anel C;

**-Flavanonas** (naringina, hesperidina): contém apenas a carbonila no carbono-4, também sem a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel C;

**-Flavonas** (luteolina, apigenina, diosmetina): contém a carbonila na posição quatro do anel C e a dupla ligação entre o carbono-2 e o carbono-3 do anel C;

**-Antocianidinas** (cianidina, pelargonidina): contém apenas a hidroxila no carbono-3 do anel C;

**-Isoflavonas** (genisteína, daidzeína): o anel B está localizado na posição carbono-3 do anel C (Figura 1) (Birt *et al.*, 2001). Estes compostos se aparentam aos estrógenos e, devido ao fato de poderem se ligar aos receptores estrogênicos, são conhecidos como fitoestrógenos (Manach *et al.*, 2004).

Os compostos exemplificados de cada classe encontram-se na Figura 2.

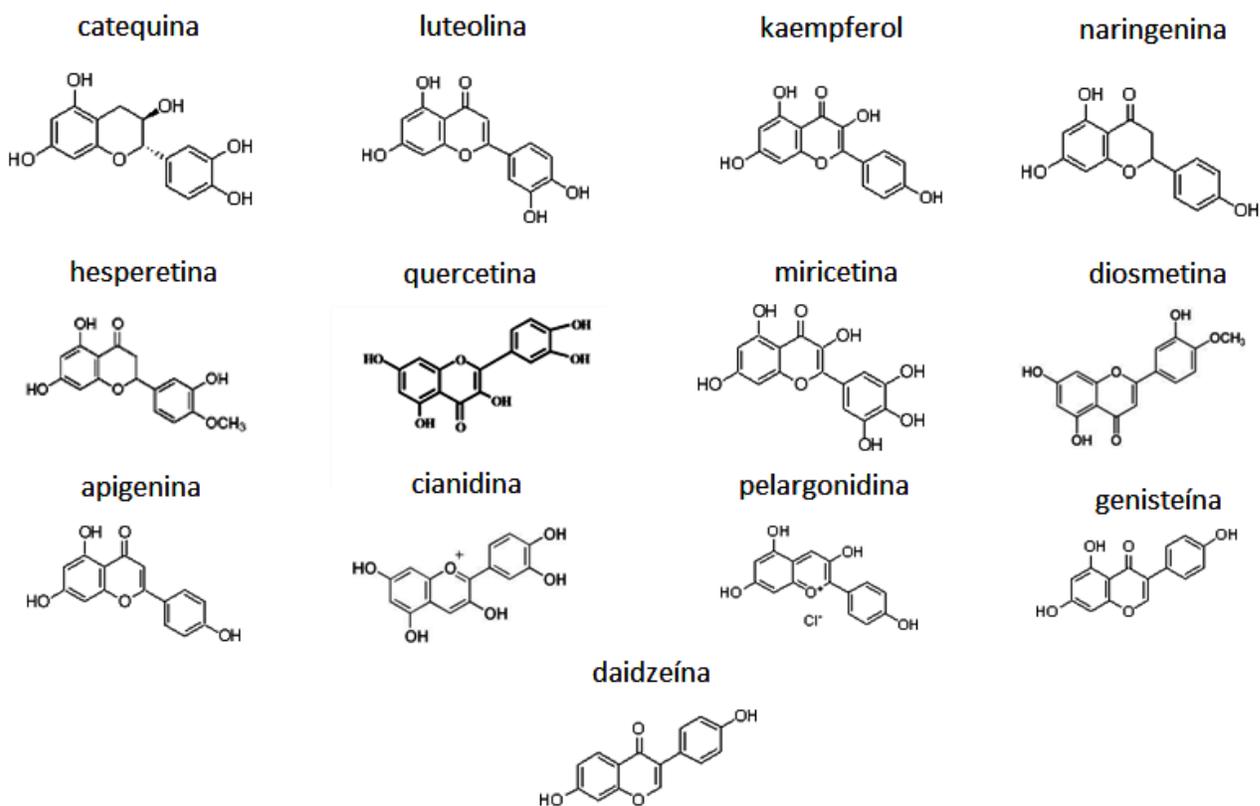
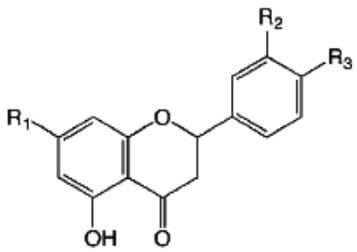
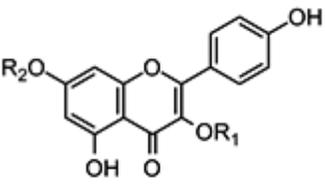


Figura 2 - Estrutura dos flavonóides, na forma aglicona, das principais classes encontradas nos alimentos.

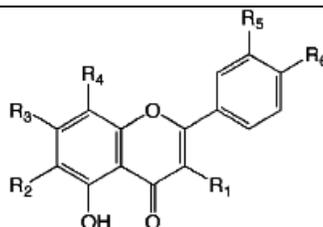
As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com as substituições incluindo a hidrogenação, as hidroxilações, as metilações, as sulfatações e as glicosilações (Tabela 1). Flavonóides e isoflavonóides ocorrem comumente como ésteres, éteres, derivados glicosídicos ou ainda como uma mistura deles, podendo receber a denominação de glico-flavonóide ou flavonóides glicosilados. As substituições glicídicas incluem D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose, lignina e arabinose (Birt *et al.*, 2001).

Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona. Os flavonóides glicosilados são mais sensíveis ao calor, porém mais solúveis, se comparados à forma aglicona (Manach *et al.*, 2004). As agliconas mais comumente encontradas na natureza são a naringenina e a hesperetina (Figura 2) (Archivio *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Principais flavonóides glicosilados encontrados nos alimentos (Gattuso *et al.*, 2007).

Composto	R1	R2	R3	R4	R5	R6
						
<b>Flavanona</b>						
didimina	O-Ru <sup>b</sup>	H	OMe <sup>a</sup>			
eriocitrina	O-Ru <sup>b</sup>	OH	OH			
hesperetina-7-O-rutinosídeo (hesperidina)	O-Ru <sup>b</sup>	OH	OMe <sup>a</sup>			
naringenina-7-O- neohesperidosídeo (naringina)	O-Nh <sup>c</sup>	H	OH			
naringenina-7-O-rutinosídeo (narirutina)	O-Ru <sup>b</sup>	H	OH			
hesperetina-7-O- neohesperidosídeo (neohesperidina)	O-Nh <sup>c</sup>	OH	OMe <sup>a</sup>			
neeriocitrina	O-Nh <sup>c</sup>	OH	OH			
poncirina	O-Nh <sup>c</sup>	H	OMe <sup>a</sup>			
						
<b>Flavonóis</b>						
kaempferol-3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil- (1,2)- $\beta$ -glicopiranosídeo-7-O- $\alpha$ - glicopiranosídeo	Ram-	Gli <sup>a</sup>				
kaempferol-7-O- $\alpha$ -L- ramnopiranosídeo	H	Ram <sup>a</sup>				
kaempferitrina	Ram <sup>a</sup>	Ram <sup>a</sup>				

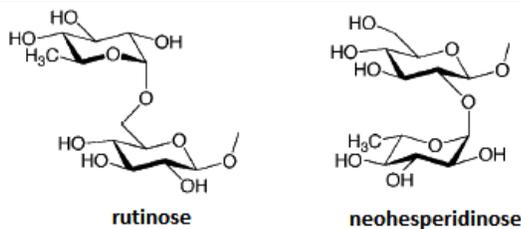
kaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo-7-O-α-ramnopiranosídeo	Gli <sup>a</sup>	Ram <sup>a</sup>				
--	------------------	------------------	--	--	--	--



### Flavonas

luteolina-6,8-di-C-glicosídeo (lucenina-2)	H	Gli <sup>a</sup>	OH	Gli <sup>a</sup>	OH	OH
apigenina-6,8-di-C-glicosídeo (vicenina-2)	H	Gli <sup>a</sup>	OH	Gli <sup>a</sup>	H	OH
stelarina-2	H	Gli <sup>a</sup>	OH	Gli <sup>a</sup>	OMe <sup>a</sup>	OH
diosmetina-6,8-di-C-glicosídeo (lucenina-2 4'-metil eter)	H	Gli <sup>a</sup>	OH	Gli <sup>a</sup>	OH	OMe <sup>a</sup>
apigenina-7-O-neohesperidosídeo-4'-glicosídeo (roifolina-4'-glicosídeo)	H	H	O-Nh <sup>c</sup>	H	OH	O-Gli <sup>a</sup>
crisoeriola-7-O-neohesperidosídeo-4'-glicosídeo	H	H	O-Nh <sup>c</sup>	H	OMe <sup>a</sup>	OH
apigenina-6-C-glicosídeo (isovitexina)	H	Gli <sup>a</sup>	OH	H	H	OH
luteolina-7-O-rutinosídeo	H	H	O-Ru <sup>b</sup>	H	OH	OH
scoparina	H	H	OH	Gli <sup>a</sup>	OMe <sup>a</sup>	OH
diosmetina-8-C-glicosídeo (orientina-4'-metil éter)	H	H	OH	Gli <sup>a</sup>	OH	OMe <sup>a</sup>
quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina)	O-Ru <sup>b</sup>	H	OH	H	OH	OH

apigenina-7-O-neohesperidosídeo (roifolina)	H	H	O-Nh <sup>c</sup>	H	OH	OH
apigenina-7-O-rutinosídeo (isorhoifolina)	H	H	O-Ru <sup>b</sup>	H	OH	OH
apigenina-7-O-rutinosídeo (isorhoifolina)	H	H	O-Nh <sup>c</sup>	H	OMe <sup>a</sup>	OH
diosmetina-7-O-rutinosídeo (diosmina)	H	H	O-Ru <sup>b</sup>	H	OH	OMe <sup>a</sup>
diosmetina-7-O-neohesperidosídeo (neodiosmina)	H	H	O-Nh <sup>c</sup>	H	OH	OMe <sup>a</sup>



<sup>a</sup>Ram – ramnose, Gli – glicose, Me – metil; <sup>b</sup>Ru – rutinose; <sup>c</sup>Nh – neohesperidosídeo.

### 1.2.2 - Flavonóides: relação estrutura/atividade antioxidante

Um dos mais importantes mecanismos de ação dos flavonóides deve-se a sua atividade antioxidante. Segundo Silva *et al.* (2002), há três requisitos na estrutura química dos flavonóides possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercida por esta classe de compostos, sendo eles:

- A presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B (Figura 3), o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos elétrons;
- A ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, o que colabora com a deslocalização eletrônica a partir do anel B;
- Os grupos hidroxilo nas posições três e cinco com função oxo, que promove a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes.

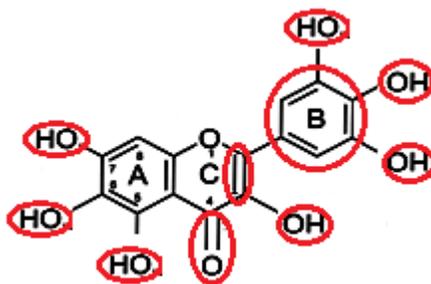


Figura 3 – Grupos responsáveis pela atividade antioxidante na molécula dos flavonóides.

A deslocalização de elétrons  $\pi$  ( $\pi$ ), gerada pela extensão de conjugação presente na estrutura dos flavonóides (carbonila cetônica em C4, ligação dupla C2-C3 e anel B, permite uma maior estabilidade das espécies intermediárias formadas, fato que favorece as reações químicas envolvidas. Tais evidências foram comprovadas através de estudos teóricos de modelagem molecular (Coutinho *et al.*, 2009).

Segundo Barreiros *et al.* (2006), os flavonóides também possuem capacidade de quelar metais de transição e de doar elétrons. De modo geral, quanto maior o número de hidroxilas na estrutura molecular, maior a atividade como agente doador de elétron, sendo assim, os flavonóides monohidroxilados apresentam atividade muito baixa, muitas vezes não detectável (Cao *et al.*, 1997). Entre os flavonóides dihidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o sistema catecol (3'-4'-dihidroxi) no anel B. Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como, por exemplo, a quercetina, a miricetina e a taxifolina possuem forte atividade antioxidante quando comparados a compostos como o  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e o  $\beta$ -caroteno (Yang *et al.*, 2001).

Deste modo, a miricetina é o flavonóide que apresenta um caráter antioxidante mais efetivo, seguida da quercetina (Figura 2). Por meio de estudos, foi constatado que este último possui uma capacidade de atuar como agente antioxidante cinco vezes superior à das vitaminas E e C (Silva *et al.*, 2002).

A atividade antioxidante de um flavonóide é, então, determinada pelo anel B (Figura 3), enquanto a estrutura base restante tem uma menor influência. Isto pode acontecer devido a uma maior capacidade eletrodoadora deste anel, havendo uma maior influência da estrutura restante após o decréscimo da atividade antioxidante do anel B. O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula torna-se um fator que contribui de forma significativa para a atividade antioxidante destes compostos (Heim *et al.*, 2002).

A aglicona parece ter melhor ação antioxidante se comparada ao flavonóide glicosilado. Isso porque, para uma ótima atividade antioxidante é necessário que a extremidade 3-OH do anel C esteja livre (Figura 3), o que não é observado nos O-glicosídeos, o que reduz a capacidade da molécula de neutralizar radicais livres (Park *et al.*, 2006a).

No entanto, recentemente, descobriu-se que a importância dos flavonóides não é apenas quanto à atividade antioxidante, mas também quanto à atividade pró-oxidante, induzindo a apoptose (morte programada) de algumas células mutantes (Archivio *et al.*, 2007). Coutinho *et al.* (2009), descreveram que os flavonóides são também potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório e que a estrutura molecular tem forte influência nesse potencial, variando entre as classes de flavonóides e apresentando maior potencial quando na forma aglicona.

### **1.2.3 - Biodisponibilidade dos flavonóides: influência da glicosilação na atividade antioxidante**

Uma evidência indireta da absorção dos flavonóides pelo intestino é o aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos que contêm estes compostos. Uma estimativa mais precisa sobre a biodisponibilidade dos flavonóides tem sido obtida pela determinação da concentração plasmática e urinária de metabólitos após a ingestão de compostos puros ou de gêneros alimentícios, fontes do composto de interesse (Scalbert & Willianson, 2000).

O mecanismo de absorção e ação dos flavonóides no organismo ainda não está totalmente esclarecido; além disto, as cinéticas de absorção variam consideravelmente entre os alimentos devido à heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo dos flavonóides. Além do mais, a absorção também é dependente da dosagem, do veículo de administração, dos antecedentes da dieta, das diferenças sexuais, da população microbiana do cólon e dos flavonóides que são absorvidos ligados às proteínas (Walle *et al.*, 2003).

Um experimento com ratos tratados cirurgicamente, em que a absorção foi restrita ao estômago, mostrou que, em nível gástrico, é possível ocorrer a absorção de alguns flavonóides livres, como a quercetina e a daidzeína, mas não de seus glicosídeos. A explicação para tal fato é que formas glicosiladas provavelmente resistem à hidrólise ácida do estômago e por isso chegam intactas ao duodeno. Mesmo assim, somente as agliconas e alguns polifenóis ligados

especificamente à glicose podem ser absorvidos no intestino delgado (Day *et al.*, 2003), enquanto os demais são eliminados do organismo sem exercer a sua função.

As formas agliconas podem ser diretamente absorvidas pelo intestino delgado; entretanto, os flavonóides estão presentes em alimentos, geralmente, na forma de ésteres e glicosídeos, ou ainda polímeros que não podem ser absorvidos na forma nativa (Heim *et al.*, 2002). A maioria dos flavonóides presentes nos alimentos ocorre principalmente na forma glicosilada de 3-O-glicosídeo e polímeros (Heim *et al.*, 2002). Para que ocorra a difusão passiva pela membrana da borda em escova do intestino delgado, é necessária a remoção do açúcar. Por este motivo, o primeiro passo do metabolismo destes compostos é a desglicosilação. Glicosidases ativas podem estar presentes em alimentos, nas células da mucosa gastrintestinal, ou podem ainda ser secretadas pela microbiota colônica (Scalbert & Williamson, 2000). Além disso, o peso molecular do composto também pode influenciar na absorção intestinal (Santos-Buelga & Scalbert, 2000).

Por outro lado, polifenóis ligados a ramnoses, quando chegam intactos ao cólon, podem ser hidrolisados por ramnosidases oriundas da microbiota, o que possibilita a sua absorção. A mesma probabilidade é aplicada a polifenóis ligados à arabinose ou à xilose (Hollman *et al.*, 1999).

A absorção no cólon ocorre mais lentamente e com menor intensidade se comparada a do intestino delgado. As razões para tanto podem ser sua pequena área de exposição e a baixa atividade dos transportadores de membrana. Condizente com a informação anterior, os flavonóides ligados a ramnoses são absorvidos mais lentamente e com menor eficácia do que as formas aglicona ou somente ligadas à glicose. Isso foi demonstrado claramente em humanos, onde a absorção máxima de quercetina 4'-glicosídeo ocorreu entre 30 e 42 minutos, enquanto a absorção máxima da mesma quantidade de rutina (quercetina-3-rutinosídeo) ocorreu entre 6 e 9 horas após a ingestão (Hollman & Katan, 1997). Esta seria uma possível justificativa para o flavonóide ligado à ramnose apresentar tempo de meia vida superior quando comparado ao ligado à glicose, pois sua absorção ocorreria no cólon (que possui  $10^{12}$  microorganismos/cm<sup>3</sup> com potencial catalítico e hidrolítico) (Scalbert & Williamson, 2000).

Algumas formas de absorção de polifenóis foram sugeridas. Segundo estudos, na porção extracelular (no intestino), podem ser encontradas enzimas responsáveis pela quebra da ligação dos flavonóides glicosilados, como a LPH (lactase-florizina-hidrolase), mais conhecida como lactase. A deficiência de LPH gera a intolerância à lactose. Com a quebra, ocorre a absorção. No entanto, caso o flavonóide glicosilado atinja o interior da célula (através do

transporte ativo, por receptores SGLT) a enzima CBG ( $\beta$ -Glicosidase citosólica), encontrada no citosol do intestino e do fígado, quebrará a ligação e formará os flavonóides na forma livre, que posteriormente serão conjugados e cairão na corrente sanguínea (Németh *et al.*, 2003).

Muitos fenóis não são metabolizados pelo citocromo P 450, pois não são substratos favoráveis para ele (Yang *et al.*, 2008). Por isso seguem para a metabolização por conjugação no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou ainda podem ser metabolizados a pequenos compostos fenólicos (Yang *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002). Ao sofrerem essas modificações, os flavonóides podem tornar-se metabólitos ainda mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares (Figura 4); dessa forma, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e nas fezes humanas (Walle *et al.*, 2003). Sendo que a maior excreção pela bile (fezes) indica baixa absorção dos polifenóis no organismo (Manach *et al.*, 2005).

O tempo exato da meia vida dos polifenóis no plasma raramente pode ser calculado com precisão, mas é de aproximadamente duas horas para as antocianinas e de duas a três horas para os flavanóis. A meia vida das isoflavonas e da quercetina é da ordem de 4-8 horas e 11-28 horas, respectivamente (Manach *et al.*, 2004).

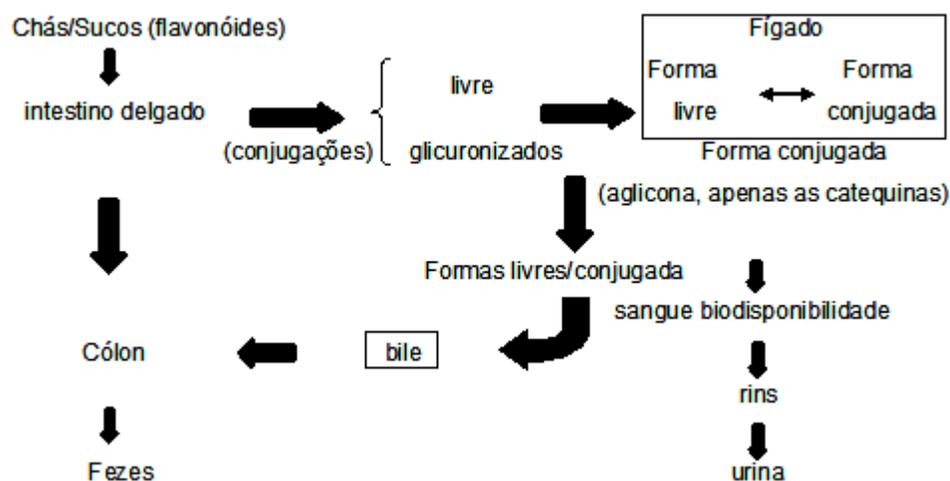


Figura 4 - Trânsito e metabolização dos flavonóides no organismo (Henning *et al.*, 2008; Manach *et al.*, 2004).

É importante enfatizar que os polifenóis mais comuns na dieta humana não são os mais ativos biologicamente. Isto ocorre por razões como a baixa atividade intrínseca, absorção intestinal reduzida ou rápida metabolização e excreção. Além disto, dados têm reportado que os metabólitos encontrados no sangue ou em órgãos alvos diferem das formas nativas das

substâncias com relação à atividade biológica; alguns deles possuem maior atividade antioxidante que a forma *in natura* (Walle *et al.*, 2003).

Entretanto, para que os flavonóides possam exercer a atividade antioxidante, extensivamente descrita na literatura (Benavente - Garcia, 1997; Ghafar *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2008), primeiramente as moléculas devem ser absorvidas pelo organismo, o que é favorecido pela retirada da fração glicosídica (Salem *et al.*, 2010), pois do contrário poderão ser eliminadas sem exercer a sua função.

#### **1.2.4 - O consumo dos flavonóides**

Os flavonóides, conforme já citado, são importantes componentes da dieta humana, sendo consumidos diariamente; porém, uma quantificação mais exata do total de flavonóides ingeridos torna-se difícil, devido à falta de tabelas com dados sobre a sua distribuição nos alimentos. Conforme estudo brasileiro, o consumo total estimado varia de 26 mg a 1 g/dia, proveniente de fontes específicas como: chás, frutas, vinhos, cerveja, vegetais, grãos, nozes, sementes e especiarias (Behling *et al.*, 2004).

A quercetina, o mais abundante flavonóide presente na dieta humana, representa cerca de 95% do total dos flavonóides ingeridos, sendo que a cebola, a maçã e o brócolis são as fontes majoritárias. A maior parte dos flavonóides consumidos provém dos chás, cacau, café e vinhos, aproximadamente 420 mg/dia, com um adicional de 290 mg/dia provenientes das frutas. Em estudo holandês, entre as frutas, a concentração média de quercetina foi de 15 mg/Kg. Para o vinho tinto o teor observado foi de 4-16 mg/L, para o suco de limão 7 mg/L, suco de tomate 3 mg/L e para a grande maioria dos sucos cítricos 5 mg/L (Hertog *et al.*, 1993).

Nos dias de hoje, a ingestão dos chamados “alimentos funcionais”, tornou-se uma necessidade com o intuito de prevenir os males da vida moderna. Dentre eles, se destacam os sucos, os chás, o chocolate, as frutas, os vinhos e as verduras (Quinabra, 2004).

#### **1.2.5 - As propriedades farmacológicas dos flavonóides**

Os alimentos que possuem os flavonóides na sua composição têm sido cada vez mais estudados devido às suas propriedades farmacológicas. Vários trabalhos descrevem os benefícios oferecidos pela dieta que contém estes compostos (Tabela 2).

Segundo McKay & Blumberg (2002), os polifenóis são capazes de inibir a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) que está associada aos riscos de aterosclerose e doenças do coração, além de apresentar importante atividade antioxidante, impedindo as disfunções endoteliais que poderiam originar doenças cardiovasculares.

Outros estudos abordam a importância dos polifenóis na prevenção de doenças de pele ao prevenir as respostas inflamatórias, a imunossupressão e o dano oxidativo quando há exposição à radiação ultravioleta (UVB) (McKay & Blumberg, 2002; Wu & Wei, 2002; Lee *et al.*, 2004; Katiyar, 2003).

Com relação ao emprego dos flavonóides no tratamento do processo inflamatório, a quercetina, o kaempferol, a hesperidina, a miricetina e a naringenina apresentaram significativa ação antiinflamatória, que foi atribuída à inibição da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Kim *et al.*, 2004; Cazarolli *et al.*, 2008), lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e à inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima iNOS (sintase de óxido nítrico) (Yoon & Baek, 2005; Santangelo *et al.*, 2007). Outros flavonóides, além dos que se destacaram, foram capazes de diminuir a produção de óxido nítrico e a expressão da enzima iNOS, dentre os quais pôde-se citar a apigenina, a luteolina, a crisina, a miricetina e a genisteína (Cazarolli *et al.*, 2008; Santangelo *et al.*, 2007). Alguns flavonóides tornaram-se conhecidos pela inibição da enzima lipo-oxigenase como a morina e a miricetina, e outros pela inibição da enzima ciclo-oxigenase como a crisina, a apigenina, a luteolina, a morina, a rutina e a galangina (Cazarolli *et al.*, 2008; Yoon & Baek, 2005; O Leary *et al.*, 2004). Os flavonóides genisteína, quercetina, luteolina, apigenina e rutina foram capazes de inibir também a secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-1) (Lopez-Posadas *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004; Cazarolli *et al.*, 2008).

Recentemente, células epiteliais de gengiva humana foram estimuladas com *Porphyromonas gingivalis*, patógeno que gera inflamação e destruição do tecido periodontal. A isoquercitrina e a astragalina (kaempferol-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo) apresentaram atividade antiinflamatória significativa frente à bactéria *P. gingivalis*. Ambos os flavonóides, nas concentrações de 10 e 25 mg/mL, inibiram a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> induzida pela bactéria, mostrando ser úteis na prevenção de periodontites (Inaba *et al.*, 2008).

Tabela 2 – Propriedades farmacológicas dos chás mate e verde e sucos de laranja e limão.

<b>Matriz alimentar</b>	<b>Propriedade farmacológica</b>	<b>Referência</b>
chá mate	indicado para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas	Bastos & Torres, 2003
	possui propriedades antioxidantes, antiinflamatória, imunomodulatória e anticancerígena	Miranda <i>et al.</i> , 2008
chá verde	possui propriedades anticarcinogênica, antimutagênica e efeitos cardioprotetores	Wiseman & Balentine, 1997
	pode atuar como antimicrobiano, imunoestimulatório e antiinflamatório	Saito & Miyata, 2000
	pode oferecer proteção contra danos isquêmicos cerebrais	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
	possui propriedade antioxidante	Cao & Ito, 2004
	pode atuar favorecendo a saúde bucal	Cabrera <i>et al.</i> , 2006; Lambert & Yang, 2003
	pode atuar inibindo infecção por <i>Helicobacter pylori</i> , pode atuar no controle de peso, favorecendo a densidade óssea e inibindo a oxidação do LDL	Yang <i>et al.</i> , 2008
sucos: laranja e limão	pode prevenir doenças coronárias e asma crônica	Dugo & Giacomo, 2002
	possui propriedades anticancerígenas, antifúngicas e pode prevenir coágulos	Ghafar <i>et al.</i> , 2009
	possui propriedade antiinflamatória	Ghafar <i>et al.</i> , 2009; Zielinska-Przyjemska & Ignatowicz, 2008

	pode atuar prevenindo a fragilidade capilar	Gattuso <i>et al.</i> , 2007
	possui propriedades antioxidantes	Benavente - Garcia, 1997; Ghafar <i>et al.</i> , 2009
	pode reduzir a produção e a liberação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e macrófagos por sua ação direta como seqüestrador ou por inibir as vias enzimáticas que geram estas espécies: NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosforilado) oxidase, xantina oxidase e mieloperoxidase	Limasset <i>et al.</i> , 1993

### 1.2.6 - Os flavonóides do chá mate

No Brasil, o chá mate é a infusão mais consumida, seguida do chá preto e de outros tipos, como por exemplo, os de frutas e os de outras ervas. Muitos dos chás de ervas são consumidos para fins medicinais segundo a sabedoria popular (Maccari & Mazuchoswki, 2000). Em alguns estados brasileiros a erva mate é bastante consumida como chimarrão ou tererê, diferindo pela forma de preparo, como a temperatura da água de infusão, a quente ou a frio respectivamente (Bastos & Torres, 2003).

O chá mate é produzido tendo como matéria-prima a *Ilex paraguariensis* e seu processamento envolve basicamente as etapas de trituração, secagem e tostagem das folhas, sendo que a erva mate se difere do chá mate apenas pela ausência da etapa de tostagem (Maccari & Mazuchoswki, 2000).

A erva mate é uma espécie florestal arbórea nativa da família Aquifoliaceae, encontrada principalmente no Brasil, na Argentina e no Paraguai (Maccari & Mazuchoswki, 2000).

Dentre os produtos do metabolismo secundário da espécie, pode-se destacar a presença de ácidos fenólicos (cafeico, clorogênico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico), dos flavonóides pertencentes à classe dos flavonóis (rutina, quercetina e kaempferol) e das metilxantinas (caféina e teobromina) (Bastos *et al.*, 2007; Filip *et al.*, 2001; Bracesco *et al.*, 2010), como mostra a Tabela 3.

Os flavonóides presentes no chá estão principalmente em sua forma glicosilada, como por exemplo, a quercetina-3-rutinosídeo, também chamada de rutina (Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006). A presença dos flavonóides, nas formas de agliconas, tem sido relatada no chá mate em níveis comparáveis aos dos chás verde e preto, como é o caso da quercetina (2500-3300 mg/kg) e do kaempferol (300-600 mg/kg) (Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006).

Tabela 3 – Composição polifenólica da *Ilex paraguariensis*.

<b><i>Ilex paraguariensis</i></b>	<b>Chandra &amp; Mejia 2004 (mg/g de folhas secas)</b>	<b>de Morais <i>et al.</i>, 2009 (mg/g erva mate tostada)</b>	<b>Tsai <i>et al.</i>, 2008 (mg/g extrato a 26% w/w)</b>
epigalocatequina galato	190,89±0,59	8,50	
ácido gálico	94,91±4,18	2,95±0,10	
catequina	82,13±3,83		
ácido 4,5-dicafeoilquínico		2,59±0,15	
ácido p-cumárico		0,06	
ácido protocateico		0,47	
ácido cafeico		0,24	0,44
ácido clorogênico		8,50±0,22	22,10
epicatequina		1,70±0,08	
galocatequina		2,37±0,10	
cafeína		5,49±0,19	
teobromina		1,35±0,04	
ácido ferúlico			
teofilina			
rutina			23,40
quercetina			0,88
kaempferol			0,27
miricetina			3,66

As xantinas, cafeína (composto com propriedade estimulante), teobromina, teofilina e os compostos fenólicos como o ácido cafeico e seus derivados, principalmente o ácido clorogênico, são também responsáveis por vários dos efeitos farmacológicos desse chá, devido

possivelmente à presença de substâncias capazes de seqüestrar os radicais livres formados no início do processo de oxidação (Bastos *et al.*, 2006; Bastos *et al.*, 2007).

No entanto, na literatura, a composição polifenólica das bebidas naturais apresenta divergência entre os vários autores, provavelmente por se tratarem de estudos provenientes de produtos naturais de países diversos.

### **1.2.7 - Os flavonóides do chá verde**

Produzidos a partir das folhas de *Camellia sinensis*, da família Theaceae, os chás verde e preto são largamente consumidos em países orientais e ocidentais, respectivamente. Devido à imigração japonesa, o chá verde também passou a ser utilizado no sudeste do Brasil, particularmente no estado de São Paulo. Esse é constituído de folhas secas colhidas de diferentes partes da planta, o que determina os vários tipos disponíveis. Além disso, as folhas velhas possuem mais catequinas se comparadas às folhas jovens (Cabrera *et al.*, 2006).

O processamento do chá verde compreende a inativação da enzima polifenoloxidase por injeção direta de vapor ou aplicação de calor indireto. Em seguida, as folhas são secas e tostadas. Já no processamento do chá preto, a presença da polifenoloxidase é de extrema importância. Esta é a enzima que promove, juntamente com o oxigênio, a oxidação das catequinas a teaflavinas (Takeo *et al.*, 1992).

Embora muitos dos trabalhos tenham envolvido os chás verde e preto, e não substâncias específicas, os efeitos benéficos são geralmente atribuídos às catequinas e as teaflavinas (Tabela 5) (Balentine *et al.*, 1997). No entanto, além delas, os chás também contêm os flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol), ácidos fenólicos, metais, aldeídos, alcoóis, hidrocarbonetos, proteínas, enzimas, óleos essenciais e carboidratos (Cabrera *et al.*, 2006). Vale ressaltar que dentre os inúmeros grupos conhecidos como flavonóides para o chá verde, os flavonóis e flavanóis são destacados (Balentine *et al.*, 1997), conforme Tabela 4 de composição do chá verde.

Os flavanóis, ou catequinas, correspondem a 75% do conteúdo de flavonóides encontrados no chá verde. A classe das catequinas inclui a epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina galato (EGCG). Estes compostos conferem sabor à bebida e por esta razão, no oriente, seu teor nas folhas é indicativo de qualidade e valor agregado ao produto. Em relação ao chá preto, um grupo de destaque é o

das teaflavinas, que são responsáveis por grande parte do sabor da infusão, contribuindo também para a formação da cor que varia de amarelada a marrom (Balentine *et al.*, 1997).

Tabela 4 – Composição polifenólica da *Camellia sinensis*.

<b><i>Camellia sinensis</i></b>	<b>Chandra &amp; Mejia 2004 (mg/g de folhas secas)</b>	<b>Khokhar &amp; Magnusdottir, 2002 (mg/g de folhas secas)</b>	<b>Tsai <i>et al.</i>, 2008 (mg/g extrato a 21,6% w/w)</b>	<b>Matsubara &amp; Rodriguez-Amaya, 2006 (mg/g de folhas secas)</b>
epigallocatequina galato	306,63±12,73	23,40±0,05		
ácido gálico	148,77±6,11			
catequina	137,19±5,79	1,30±0,02		
epigallocatequina		19,00±0,09		
ácido cafeico			2,30	
ácido clorogênico			0,12	
epicatequina galato		5,60±0,03		
epicatequina		4,40±0,03		
cafeína		19,50±0,30		
rutina			6,65	
quercetina				2,50±0,10
kaempferol			0,97	1,10±0,10
miricetina				0,70±0,10

Tabela 5 - Teaflavinas formadas a partir dos pares de catequinas (Balentine *et al.*, 1997).

Catequinas	Teaflavinas
epicatequina (EC) + epigalocatequina (EGC)	teaflavina
epicatequina galato (ECG) + epigalocatequina (EGC)	teaflavina-3-galato
epicatequina (EC) + epigalocatequina galato (EGCG)	teaflavina-3'-galato
epicatequina galato (ECG) + epigalocatequina galato (EGCG)	teaflavina-3-3'-digalato

### 1.2.8 - Os flavonóides dos sucos cítricos

Com mais de um milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, o Brasil tornou-se, na década de 80, o maior produtor mundial da laranja. A maior parte da produção brasileira da fruta destina-se à indústria do suco, fortemente concentrada no estado de São Paulo (Benavente - Garcia *et al.*, 1997).

As frutas cítricas, como por exemplo a laranja e o limão, possuem uma considerável quantidade de flavonóides, responsáveis pelas suas atividades farmacológicas (Ghafar *et al.*, 2009). Alguns flavonóides são muito amargos enquanto outros não o são, dependendo do tipo de cadeia glicosídica que os mesmos apresentam. A naringina, por exemplo, confere sabor amargo ao limão, à laranja e à uva (Quinabra, 2004); a neohesperidina também é muito amarga, enquanto a hesperidina não possui sabor (Galarraga, 2008). A diosmina é outro tipo de flavonóide que pode ser encontrado no limão e na laranja lima (Quinabra, 2004).

As laranjas e seus sucos são boas fontes de flavonóides glicosilados e contêm cerca de 40 mg desses em 100 g do alimento, mas perdas consideráveis ocorrem com a remoção da casca, antes do consumo ou no processo industrial (Galarraga, 2008). A Tabela 6 apresenta a concentração da hesperidina em alguns sucos de laranja industrializados no Brasil (Galarraga, 2008).

Tabela 6 - Concentração de hesperidina nos sucos de laranja brasileiros (Galarraga, 2008).

Suco	Hesperidina (mg/L)
suco de laranja espremido manualmente	104-537
suco de laranja concentrado e congelado	531-690*

\*Após diluição para 12º Brix.

Os flavonóides das frutas cítricas - hesperidina e naringina - são resistentes ao suco gástrico do estômago, sendo absorvidos no trato gastrintestinal (Ameer *et al.*, 1996; Hollman & Katan, 1999). A análise dos produtos de excreção urinária após a ingestão de flavanonas isoladas (naringina e hesperidina) de sucos de laranja, evidenciou a presença de metabólitos destes compostos na urina, comprovando a sua absorção pelo organismo (Ameer *et al.*, 1996). Foi verificada ainda uma variação considerável na taxa de absorção entre os indivíduos, possivelmente devido às diferenças da ação da microbiota gastrintestinal na desglicosilação das flavanonas (Erlund *et al.*, 2002).

Alguns estudos têm mostrado que as concentrações plasmáticas máximas de hesperetina e naringenina (agliconas) variam após o consumo de sucos cítricos (Erlund *et al.*, 2001, 2002; Manach *et al.*, 2003). Após a ingestão de cerca de 500 mL de suco de laranja, essas concentrações variam entre  $0,46 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$  e  $2,20 \pm 1,58 \mu\text{mol/L}$  para hesperetina e de  $0,06 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$  a  $0,64 \pm 0,40 \mu\text{mol/L}$  para a naringenina (Manach *et al.*, 2003; Erlund *et al.*, 2001). No entanto, ainda não foi observado o acúmulo de flavanonas no plasma (Erlund *et al.*, 2002). O tempo de meia-vida plasmática destes compostos é de cerca de uma a duas horas após a ingestão e a excreção urinária é dose - dependente, isto é, proporcional à ingestão de flavanonas (Benavente - Garcia, 1997). A composição polifenólica da laranja Pêra, e do limão Tahiti, ambos da família Rutaceae, pode ser conferida nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – Composição polifenólica da *Citrus sinensis* mg/100 mL.

<i>Citrus sinensis</i>	Gattuso et al., 2007	Mouly et al., 1996	Kawaii et al., 1999	Pupin et al., 1998	Careri et al., 1999
didimina		1,89±0,92			
eriocitrina		0,31±0,18			
hesperidina	28,60±11,90				
narirutina	5,20±3,10				
neoeriocitrina			0,59		
poncirina			1,04±0,78		
roifolina			0,05		
isoroifolina			0,07		
diosmina			0,09		
neodiosmina			0,08		
heptametoxiflavona			0,08±0,06	0,08±0,06	
nobiletina			0,33±0,19	0,33±0,19	
sinensetina			0,37	0,37	
tangeretina			0,04±0,04	0,04±0,04	
taxifolina			0,03		
acacetina			0,03		
naringina					2,13±3,01

Tabela 8 – Composição polifenólica da *Citrus aurantifolia* mg/100 mL (Kawaii et al., 1999).

<i>Citrus aurantifolia</i> (mg/100 mL)	
natsudaídaina	0,04
eriocitrina	0,29
hesperidina	1,77
tangeretina	0,18
neoeriocitrina	0,01
luteolina	0,61
diosmina	0,08
heptametoxiflavona	0,12
nobiletina	0,52
taxifolina	0,04

### 1.3 - Biotransformação de polifenóis

A biotransformação consiste em uma alteração química na molécula sob a ação de enzimas específicas ou inespecíficas. Muitas vezes, os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das propriedades do substrato que os originou; contudo, nem todas as moléculas biotransformadas são inativadas - muitas vezes elas podem ter sua atividade aumentada (Meyer, 1996; Rang *et al.*, 2001).

Para que uma reação de biotransformação ocorra, são necessárias enzimas, substratos de atuação, meio reacional e condições que podem favorecer a velocidade da reação, como o pH, a temperatura e a concentração enzimática.

Devido à disponibilidade dos polifenóis na natureza, eles são alvos de fácil obtenção para a realização de biotransformações, uma vez que qualquer alteração, mesmo que mínima, na estrutura dos flavonóides pode levar ao aumento, diminuição ou até mesmo na anulação dos efeitos já apresentados pelos mesmos. As reações de biotransformações têm sido uma alternativa promissora para a busca de novas substâncias potencialmente ativas, derivadas de substâncias conhecidas e ativas biologicamente.

Os estudos envolvendo as biotransformações de flavonóides têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Dentre as reações mais estudadas, destacam-se as reações de oxidação, redução, clivagens de anel, conjugação e a reação de desglicosilação. Estas reações incluem o uso de enzimas ou de microorganismos como biocatalisadores.

Os benefícios dos polifenóis dos chás e das bebidas cítricas já estão cientificamente comprovados; entretanto, relatos de processos biotecnológicos de modificação enzimática que resultem na melhoria da funcionalidade e biodisponibilidade destes polifenóis são, até o presente, escassos.

Um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo realizado em humanos relatou uma melhoria significativa na biodisponibilidade do metabólito após a modificação enzimática da hesperidina do suco de laranja. O produto hesperetina-7-glicosídeo gerado após a remoção do grupo ramnose deste polifenol pela enzima hesperidinase comercial gerou uma concentração plasmática da aglicona quatro vezes maior quando comparada à bebida não modificada (Nielsen *et al.*, 2006).

Outro trabalho relatou a bioconversão da naringina e da naringenina em seus análogos, como alternativa sintética, utilizando cepas *Mucorales* M6 e M16. O estudo teve como objetivo

elucidar a influência das modificações estruturais que ocorrem durante o metabolismo desses compostos, visando o desenvolvimento de produtos nutricionais ou semi-síntese de substâncias análogas que apresentassem alta capacidade antioxidante e efeitos adversos mínimos (Cunha *et al.*, 2007).

Modificações de moléculas complexas por métodos químicos podem ser difíceis, entretanto a utilização da biotransformação pode ser uma estratégia alternativa. Segundo estudo, a naringina, flavonóide presente em frutas cítricas, é utilizada tradicionalmente na medicina chinesa como antiinflamatório e antioxidante; já a sua aglicona, naringenina, além dessas propriedades, tem demonstrado a capacidade de inibir a proliferação de células cancerosas (Cunha *et al.*, 2007).

Em outro trabalho, a enzima ramnosidase de *Aspergillus aculeatus* foi utilizada na modificação do chá verde, do suco de laranja e do suco de groselha negra para a remoção do grupo ramnosil terminal dos flavonóides rutinosídeos encontrados nessas três bebidas (antocianinas de suco de groselha negra, flavonol de chá verde e flavanonas de suco de laranja). Entretanto, embora os autores justifiquem as modificações visando à melhoria da biodisponibilidade, nenhum ensaio *in vivo* foi realizado para comprovar tais efeitos (González-Barrio *et al.*, 2004).

Em trabalho recente, uma nova linhagem de *Paecilomyces variotti* produtora de tanase, isolada e caracterizada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UNICAMP, foi utilizada na hidrólise da EGCG do chá verde, gerando os produtos EGC e ácido gálico, os quais apresentaram maior poder antioxidante *in vitro* se comparados ao substrato (Battestin *et al.*, 2008). Outro estudo da UNICAMP utilizou a mesma enzima em chá verde e em erva mate, também apresentando bons resultados quanto ao aumento da atividade antioxidante pós biotransformação (Macedo *et al.*, 2011).

A associação de diferentes enzimas tem se mostrado útil na modificação dos complexos polifenóis presentes em frutas, legumes e bebidas. As enzimas  $\beta$ -galactosidase e hesperidinase foram eficientemente usadas, em associação, na hidrólise dos glicosídeos de kaempferol-3-O-[2-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e kaempferol-3-O-[2-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo presentes no chá verde, o que gerou 95% da aglicona de kaempferol, que foi mais eficiente como antioxidante segundo o teste DPPH, além de apresentar efeito inibitório da xantina oxidase (Park *et al.*, 2006a). O kaempferol também se mostrou útil na inibição da enzima 5- $\alpha$ -redutase, enzima responsável pela

conversão da testosterona em diidrotestosterona, composto responsável por alguns efeitos adversos, como alopecia, acne e câncer de próstata (Park *et al.*, 2006b).

Em outro estudo, pesquisadores utilizaram a glicoamilase e a  $\alpha$ -L-ramnosidase em uma solução contendo  $\alpha$ -glicosil hesperidina e hesperidina, a fim de obter  $\alpha$ -monoglicosil hesperidina (Miyake *et al.*, 2000).

Estudo utilizando saponinas obteve estes mesmos compostos, porém com menor peso molecular, após hidrólise enzimática das moléculas maiores presentes em ginseng, utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, lactase e hesperidinase de *Penicillium* sp, e naringinase de *Penicillium decumbens*. A principal saponina gerada após a ação da naringinase (20-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-20-(S)-protopanaxatriol) é o mesmo metabólito oriundo da microbiota intestinal humana (Ko *et al.*, 2003).

### 1.3.1 - Enzimas para hidrólise dos flavonóides glicosilados

#### 1.3.1.1 - Ramnosidase

As ramnosidases, enzimas glicosídicas, podem ser produzidas por fungos (Manzanares *et al.*, 2000; Gallego *et al.*, 2001) mais comumente pelo *Penicillium* sp., *Penicillium decubens* e pelo *Aspergillus niger* ou por bactérias *Bacillus* sp. GL1 (Hashimoto *et al.*, 1999).

A **hesperidinase** (1,6- $\alpha$ -L-ramnosidase, E.C. 3.2.1.40), um tipo de ramnosidase, é a enzima que atua sobre a molécula da hesperidina (Monti *et al.*, 2004), podendo apresentar também ação  $\beta$ -D-glicosidase (Figura 5). A hesperidina possui a ramnose que seria o fator limitante para uma maior biodisponibilidade desse flavonóide. A remoção da ramnose pela hesperidinase provoca a formação da molécula hesperetina-7-glicosídeo a partir da molécula hesperetina-7-O-rutinosídeo, o que proporciona melhoras na biodisponibilidade da molécula (Nilsen *et al.*, 2006).

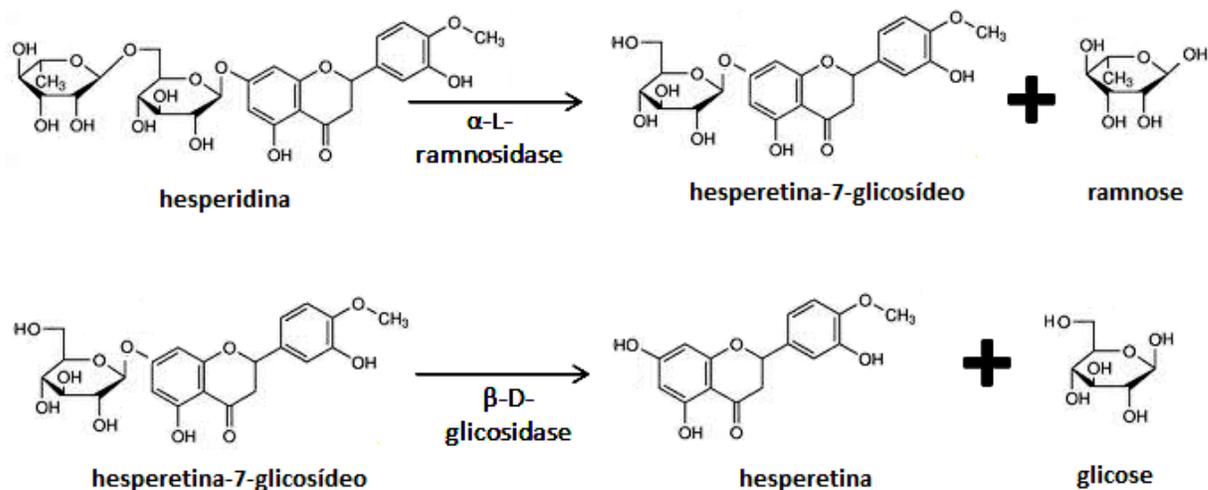


Figura 5 - Etapas da hidrólise da hesperidina pela hesperidinasase.

A **naringinase** (1,6- $\alpha$ -L-ramnosidase, E.C. 3.2.1.40) é um complexo enzimático com atividade  $\alpha$ -L-ramnosidase e  $\beta$ -D-glicosidase. Apresenta potencial de aplicação na produção de ramnose, que pode ser utilizada como componente de fármacos, de prunina que tem ação antiinflamatória e pode ser utilizada também como adoçante para diabéticos. Os produtos da ação da naringinase podem, ainda, ser utilizados no realce do aroma de vinhos e na indústria de sucos cítricos por degradar a naringina, formando compostos menos amargos (Soria *et al.*, 2004; Signoretti & Macedo, 2010). Essa enzima catalisa a conversão da naringina em naringenina em um processo de duas etapas (Figura 6). O substrato naringina (4'-5,7'-trihidroxiflavonona-7-ramnoglicosídeo) é hidrolisado pela porção  $\alpha$ -L-ramnosidase para produzir ramnose e prunina (4'-5,7'-trihidroxiflavonona-7-glicosídeo), que é então convertida pela porção  $\beta$ -D-glicosidase em glicose e naringenina (4'-5,7'-trihidroxiflavonona) (Norouzian *et al.*, 2000).

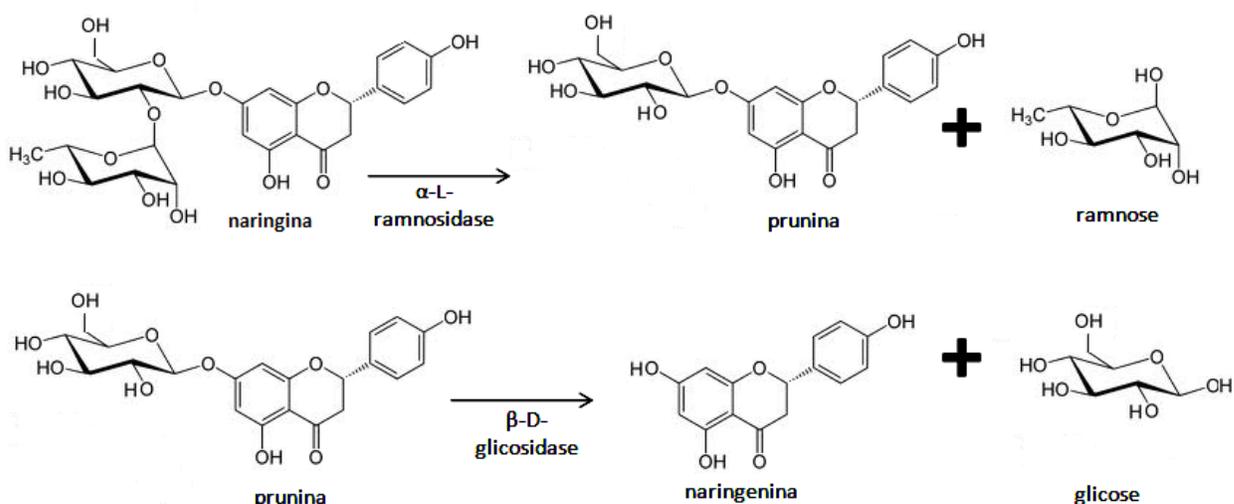


Figura 6 - Etapas da hidrólise da naringina pelo complexo naringinase (Norouzian *et al.*, 2000).

### 1.3.1.2 - Glicosidase

A glicosidase (1,4-β-D-glicosidase, E.C. 3.2.1.21) pode ser produzida por fungos (*Aspergillus niger*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) ou bactérias (*Bacillus stearothermophilus*), além de ser encontrada em animais. Essa enzima é capaz de hidrolisar os flavonóides glicosídeos produzindo as formas agliconas, compostos com maior ação antioxidante (de Aguiar, 2010; Carrão-Panizzi & Bordignon, 2000).

Pela importância dessa enzima, conduziu-se um estudo para determinar a atividade da glicosidase em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) com teores diferenciados de isoflavonóides glicosídeos (substratos da enzima). Entre as cultivares, não houve correlação significativa entre o teor de isoflavonóides glicosídeos e a atividade da enzima. Hoje é conhecido que os isoflavonóides estão relacionados com a adstringência observada no sabor da soja (Carrão-Panizzi & Bordignon, 2000). Devido à importância desta enzima para a indústria alimentícia, verificou-se que o *Penicillium purpurogenum* foi capaz de produzir glicosidase intracelular, com atividade máxima sobre a sacarose. Verificou-se também que a produção máxima da enzima ocorria após 96 horas de cultivo a 30°C (Dhake & Patil, 2005).

Neste trabalho a glicosidase poderá atuar em diversos substratos como na hesperidina e na naringina dos sucos ou na rutina dos chás, após a clivagem da fração ramnose dessas moléculas pelas enzimas ramnosidases (hesperidinase ou naringinase) (Figura 7).

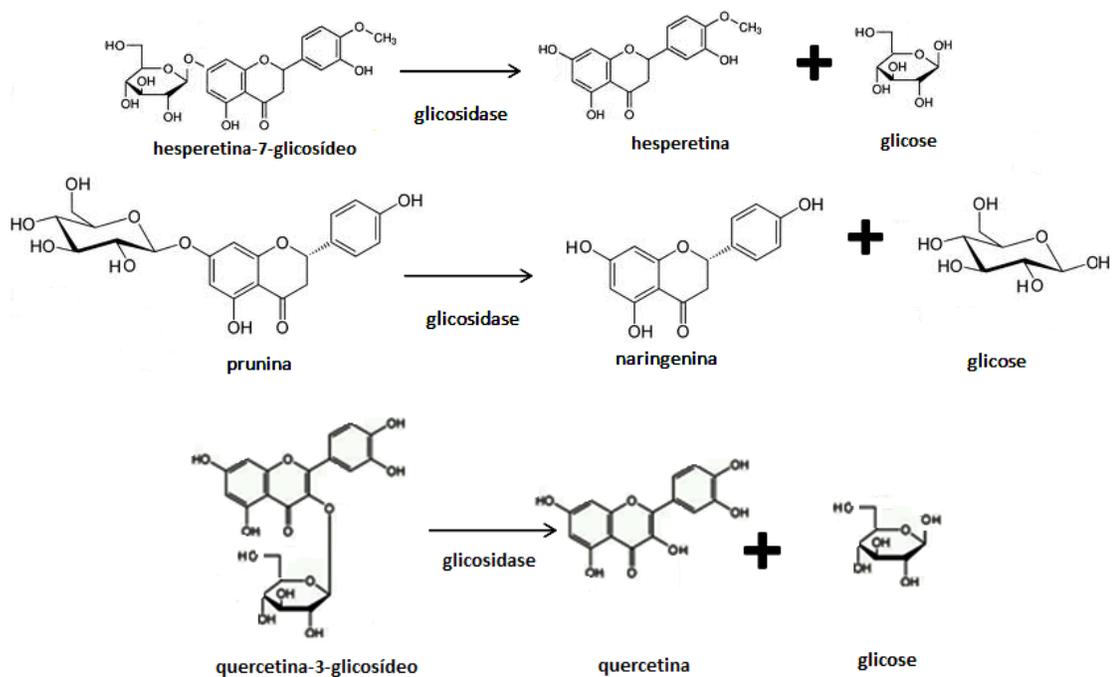


Figura 7 – Hidrólise dos flavonóides glicosilados pela enzima glicosidase.

### 1.3.1.3 - $\beta$ -galactosidase

As enzimas  $\beta$ -galactosidasas ( $\beta 1 - 4$ , E.C. 3.2.1.23), popularmente conhecidas como lactases, são as responsáveis por clivar o resíduo terminal  $\beta$ -galactopiranosil da lactose (Gal  $\beta 1 - 4$  Glc) liberando os monossacarídeos glicose e galactose (açúcares redutores). Elas podem ser encontradas na natureza distribuídas entre os vegetais (principalmente em amêndoas, pêsego, damasco e maçã), em órgãos animais como intestino, cérebro, testículos, placenta e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos (*Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*), bactérias (*Escherichia coli*) e leveduras (*Kluyveromyces lactis*; *Kluyveromyces marxianus*), podendo ainda ser encontradas em ambientes aquáticos (Santiago *et al.*, 2004; Colombo, 2006). As leveduras e os fungos são as fontes preferidas desta enzima para aplicações comerciais (Santiago *et al.*, 2004).

A importância industrial da  $\beta$ -galactosidase está na sua aplicação na indústria de laticínios. Esta enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite em seus monossacarídeos, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose, melhorando a solubilidade e a digestibilidade do leite e dos derivados lácteos, ideais para os consumidores

intolerantes à lactose. A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal e ocorre devido aos baixos níveis (ou ausência) da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase no aparelho digestivo, consequência de uma deficiência congênita desta enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade, causando sintomas como diarreia ácida e gasosa, fortes dores abdominais e inchaços. Além dessa vantagem, a hidrólise da lactose previne a sua cristalização em produtos lácteos e melhora as características organolépticas destes alimentos como a cor e o sabor. A quebra deste açúcar também favorece a cremosidade das misturas para sorvete e diminui o tempo de maturação dos queijos (Santiago *et al.*, 2004).

A  $\beta$ -galactosidase pode ser uma enzima útil na biotransformação dos flavonóides glicosídeos de chás em flavonóides aglicona (Figura 8). Park *et al.* (2006a) demonstraram que as enzimas  $\beta$ -galactosidase e hesperidinaase foram eficientemente usadas em associação na hidrólise dos glicosídeos de kaempferol-3-O-[2-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil] -  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e kaempferol-3-O-[2-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-glicopiranosídeo presentes no chá verde, o que gerou 95% da aglicona de kaempferol que foi mais eficiente como antioxidante segundo o teste DPPH.

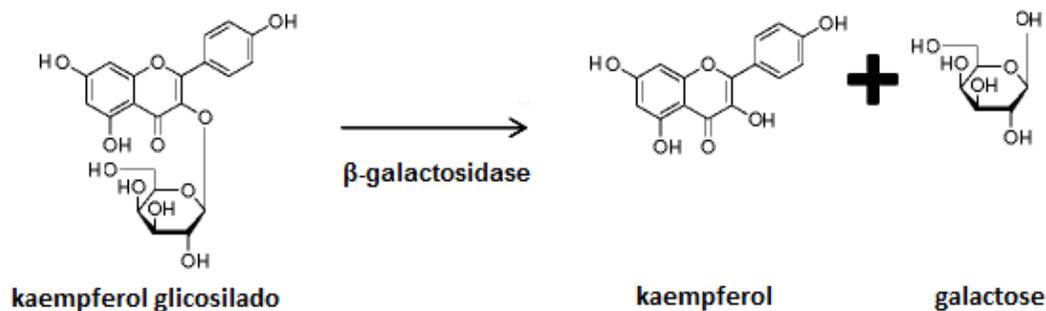
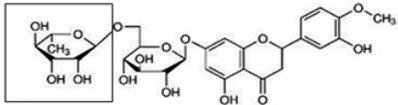
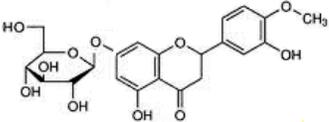
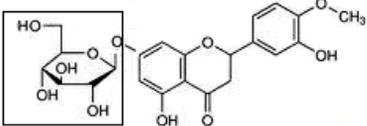
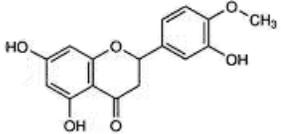
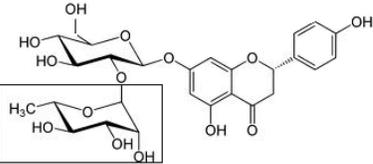
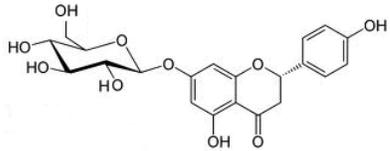
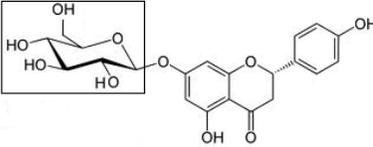
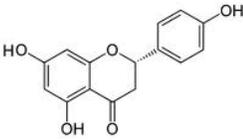


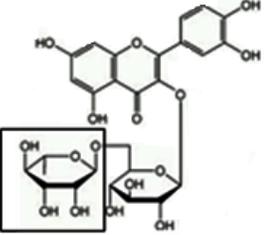
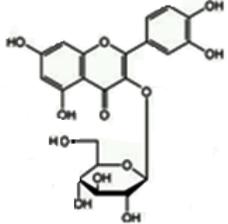
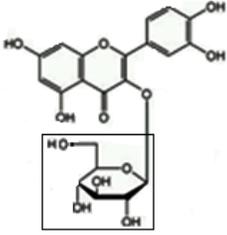
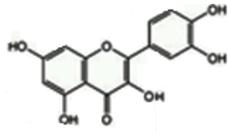
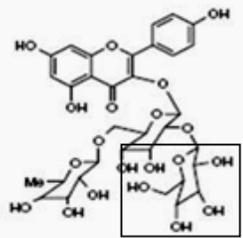
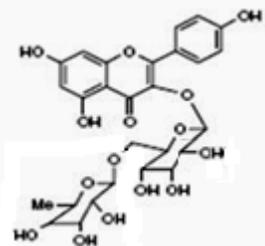
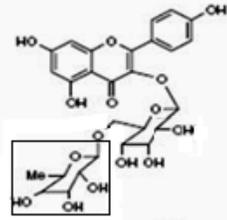
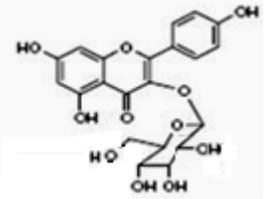
Figura 8 - Etapa da hidrólise da molécula de kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo em kaempferol aglicona.

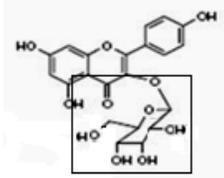
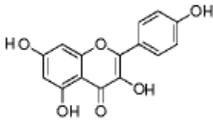
#### 1.3.1.4 - Atuação enzimática nos polifenóis das matrizes alimentares estudadas

Considerando os flavonóides existentes nas matrizes alimentares estudadas (chás mate, verde e sucos de laranja e limão) a Tabela 9 ilustra as possíveis biotransformações.

Tabela 9 – Proposta de atuação enzimática sobre os possíveis polifenóis encontrados nas matrizes alimentares estudadas.

Substrato	Enzima	Produto
<p>hesperidina (hesperetina-7-rutinosídeo)</p> 	<p>hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp ação <math>\alpha</math>-L-ramnosidase (retirada da ramnose)</p>	<p>hesperetina-7-glicosídeo</p> 
<p>hesperetina-7-glicosídeo</p> 	<p>hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp ou glicosidase de <i>Aspergillus niger</i> ação <math>\beta</math>-D-glicosidase (retirada da glicose)</p>	<p>hesperetina (aglicona)</p> 
<p>naringina (naringenina-7-ramnoglicosídeo)</p> 	<p>naringinase de <i>Penicillium decubens</i> ação <math>\alpha</math>-L-ramnosidase (retirada da ramnose)</p>	<p>naringenina-7-glicosídeo</p> 
<p>naringenina-7-glicosídeo</p> 	<p>naringinase de <i>Penicillium decubens</i> ou glicosidase de <i>Aspergillus niger</i> ação <math>\beta</math>-D-glicosidase (retirada da glicose)</p>	<p>naringenina (aglicona)</p> 

<p>rutina (quercetina-3-rutinosídeo)</p> 	<p>hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp ação <math>\alpha</math>-L-ramnosidase (retirada da ramnose)</p>	<p>quercetina-3-glicosídeo</p> 
<p>quercetina - 3- glicosídeo</p> 	<p>hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp ação <math>\beta</math>-D-glicosidase (retirada da glicose)</p>	<p>quercetina (aglicona)</p> 
<p>kaempferol-3-O-[2-O-<math>\beta</math>-D-galactopiranosil-6-O-<math>\alpha</math>-L-ramnopiranosil]-<math>\beta</math>-D-glicopiranosídeo</p> 	<p><math>\beta</math>-galactosidade de <i>Aspergillus oryzae</i> ação <math>\beta</math>-galactosidase (retirada da galactose)</p>	<p>kaempferol glicosilado complexo</p> 
<p>kaempferol glicosilado complexo</p> 	<p>hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp ação <math>\alpha</math>-L-ramnosidase (retirada da ramnose)</p>	<p>kaempferol glicosilado</p> 

<p>kaempferol glicosilado</p> 	<p>hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp ação <math>\beta</math>-D-glicosidase (retirada da glicose)</p>	<p>kaempferol (aglicona)</p> 
---	---	--

#### 1.4 - Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante

Em condições normais o corpo humano produz continuamente radicais livres que são contrabalanceados por mecanismos de defesa antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Caso a produção de radicais livres supere a capacidade antioxidante em um sistema vivo, as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem reagir com os lipídios, as proteínas e com o DNA, conduzindo a dano estrutural e/ou funcional nas células, enzimas e material genético (Barreiros *et al.*, 2006). Desta maneira, várias patologias incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e de Parkinson, doenças inflamatórias e imunológicas apresentam em sua etiologia, pelo menos em parte, os efeitos danosos da produção de radicais livres em consequência do estresse oxidativo (Tomei & Salvador, 2007).

O interesse por produtos naturais que poderiam favorecer a atividade antioxidante se expandiu em meados dos anos 90. Da mesma forma, tornou-se crescente também a busca e a validação de metodologias para a avaliação da atividade antioxidante em matrizes complexas como alimentos, produtos naturais e fluidos biológicos (Sanchez-Moreno, 2002; Roginski & Lissi, 2005).

Os ensaios antioxidantes hoje disponíveis podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, denominados métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, denominados de métodos indiretos (Huang *et al.*, 2005).

Os métodos diretos baseiam-se na presença de uma competição entre uma substância oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres (Roginski & Lissi, 2005). Dentre os ensaios que se baseiam nesse método estão o ORAC, o  $\beta$ -caroteno e a Quimioluminescência do luminol.

Nos ensaios indiretos o processo é caracterizado por uma reação de oxi-redução entre o oxidante (geralmente para monitorar a reação) e o antioxidante. Estes ensaios estão baseados na seguinte reação de transferência de elétrons:

oxidante + e<sup>-</sup> do antioxidante → oxidante reduzido + antioxidante oxidado.

A substância reduzida pelo antioxidante sofre mudanças colorimétricas. A intensidade da mudança de cor é proporcional à atividade deste antioxidante ou à concentração do mesmo (Benzie & Strain, 1999). Dentre os ensaios que se baseiam nesse método estão o Folin-Ciocalteu, o DPPH, o TEAC e o FRAP.

O presente trabalho utilizou tanto metodologias diretas como metodologias indiretas para a avaliação da capacidade antioxidante das amostras estudadas.

## **2 - OBJETIVO**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Estabelecer processos enzimáticos para a biotransformação dos polifenóis presentes nas bebidas brasileiras (chás mate, verde e sucos de laranja e limão) visando à melhoria de suas atividades antioxidantes *in vitro*.

### **2.2 - Objetivos específicos**

-Determinar a atividade de hidrólise de diferentes enzimas comerciais (hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase) capazes de atuar nos substratos rutina ou kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo (padrões), através da quantificação de açúcares redutores liberados nas condições de reação;

-Estabelecer as melhores condições de reação (temperatura e pH ótimos) para cada enzima a ser utilizada nas reações de biotransformação;

-Estudar e desenvolver reações de biotransformação dos polifenóis dos chás (mate e verde) fazendo uso das enzimas hesperidinase e  $\beta$ -galactosidase, e dos sucos (laranja e limão) utilizando as enzimas hesperidinase, naringinase e glicosidase comerciais, isoladas ou em associação;

-Avaliar a capacidade antioxidante das bebidas após a biotransformação utilizando os métodos FRAP, DPPH,  $\beta$ -caroteno e ORAC, comparada às bebidas não biotransformadas;

-Caracterizar quimicamente as amostras após a biotransformação, fazendo uso da espectrometria de massas ESI-MS (modo negativo), comparada às amostras não biotransformadas.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Substratos e formas de preparo

As ervas para o preparo dos chás mate (*Ilex paraguariensis*) e verde (*Camellia sinensis*) foram obtidas no comércio local, na cidade de Bragança Paulista, do fornecedor Leão Júnior S.A.

Os sucos das frutas foram preparados a partir da laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e do limão Tahiti (*Citrus aurantifolia*), adquiridos também no município de Bragança Paulista, no início do mês de abril do ano de 2010.

Os substratos para a biotransformação foram preparados da seguinte forma:

-Os chás foram obtidos por infusão de 40 g de erva em 800 mL de água destilada em ebulição, durante 10 minutos, seguido de filtração com o auxílio de um funil de vidro e papel de filtro.

-Os sucos foram obtidos por meio da trituração da fruta inteira (sem a casca) em liquidificador e foram utilizados sem qualquer diluição e filtração.

Os substratos foram preparados, de uma só vez, em quantidades suficientes para todos os testes realizados. Para garantir a integridade dos substratos até a realização de todos os testes propostos, após a biotransformação, eles foram liofilizados e armazenadas em freezer (-14°C a -18°C).

#### 3.2 - Enzimas

As enzimas hesperidinase de *Penicillium* sp, naringinase de *Penicillium decubens*, glicosidase de *Aspergillus niger* e  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foram obtidas, liofilizadas, da empresa Sigma-Aldrich (USA).

#### 3.3 - Reagentes

AAPH (2,2-azobis amidinopropano); acetato de sódio; acetona; ácido acético glacial; ácido clorídrico concentrado; ácido linoléico; álcool metílico;  $\beta$ -caroteno; carbonato de sódio; cloreto de alumínio; cloreto férrico; clorofórmio; DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila); fluoresceína; Folin<sup>®</sup> (molibdato, tungstato e ácido fosfórico); G-hesperidina padrão; hesperidina padrão; hidróxido de

amônio; hidróxido de sódio concentrado; kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo padrão; nitrito de sódio; quercetina padrão; rutina padrão; SN1 (sulfato de cobre cristalino em água); SN2 (tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio); sulfato ferroso; tampão acetato 0,05 M pH 5,0; tampão fosfato pH 7,2; tartarato de sódio; TPTZ (2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium); Trolox<sup>®</sup> (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e tween 40.

### **3.4 - Equipamentos**

-Espectrômetro: espectrômetro de massas, Micromass Q-TOF, modo negativo (analísadores: TOF - tempo de vôo combinado à quadrupolo).

-Espectrofotômetros: leitor de microplaca de fluorescência Biotek Synerg-2; espectrofotômetro leitor de microplacas TP-Reader; espectrofotômetro UV/Vis Jenway 6105.

Agitador de tubos Phoenix AP 56; balança analítica Scientech AS 210; banho-maria Fanem 146; capela Permutation 220 v; centrífuga Hermle Z323K; incubadora refrigerada com agitação Tecnal TE-421; liofilizador Heto Drywinner; liquidificador Waring; manta aquecedora magnética Fisatom 752; pHmetro Digimed DM-20.

### **3.5 - Determinação da atividade enzimática na hidrólise de flavonóides glicosilados**

A atividade de cada enzima (hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase) na hidrólise dos flavonóides foi determinada utilizando dois tipos de flavonóides glicosilados (padrões Sigma Aldrich) como substratos: a rutina e o kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo, a 10 mg/mL em tampão acetato 0,05 M pH 5,0. As enzimas hesperidinase, naringinase e glicosidase atuaram sob o flavonóide rutina, enquanto, a  $\beta$ -galactosidase atuou sobre o kaempferol glicosilado.

A atividade enzimática foi determinada através da quantificação do açúcar redutor formado na reação segundo o método de coloração de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945) com modificações.

Para a reação enzimática foram pipetados 4,0 mL dos substratos, adicionados 1,0 mL da solução enzimática (0,02 ou 0,07 mg/mL em solução aquosa com diferentes valores de pH, conforme recomendações do fabricante) e incubados por 20 minutos em diferentes valores de

temperatura, conforme Tabela 10. Em seguida, o material foi colocado em banho de gelo e seguiu para a reação de coloração.

Tabela 10 – Condições de reação para a determinação da atividade enzimática de hidrólise dos flavonóides glicosilados pelas enzimas hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase.

<b>Substratos (padrões)</b>	<b>Enzimas<sup>a</sup> (mg/mL)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
rutina	H (0,02)	3,8	40
rutina	N (0,02)	4,0	40
rutina	Gli (0,02)	4,0	37
kaempferol <sup>b</sup>	Ga (0,07)	4,5	30

<sup>a</sup>H-hesperidinase, N-naringinase, Gli-glicosidase, Ga- $\beta$ -galactosidase.

<sup>b</sup>kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.

pH e temperatura adotados conforme recomendação do fabricante.

Os açúcares redutores foram quantificados utilizando 0,5 mL da solução de reação, descrita acima, adicionados de 1,0 mL do reagente SN 1 (sulfato de cobre cristalino em água). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria por 6 minutos a 100°C, em seguida foram transportados para o banho de gelo. Ao atingir a temperatura ambiente, foram adicionados mais 1,0 mL do reagente SN 2 (tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio) e os tubos foram posteriormente deixados em repouso, durante 5 minutos. A esses tubos foram adicionados 10 mL de água destilada e foram agitados por inversão. A absorbância foi lida a 540 nm contra o branco (mesmo procedimento, porém, ao invés da amostra foram adicionados 0,5 mL de água destilada) (Somogyi, 1945). A curva padrão utilizada foi a de glicose nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,30 e 0,40 mg/mL.

### **3.6 - Determinação das condições ótimas para a atuação enzimática**

Com o objetivo de confirmar os dados fornecidos pelo fabricante, diferentes ensaios para a determinação das condições ótimas de temperatura e pH para a atuação de cada enzima foram realizados.

Para a determinação da temperatura ótima, 4,0 mL da solução dos substratos (rutina ou kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo a 10 mg/mL em tampão acetato 0,05 M pH 5,0) foram adicionados aos tubos previamente identificados. Os tubos foram pré-incubados (temperaturas descritas na Tabela 11) e adicionados de 1,0 mL de solução enzimática (em solução aquosa com valores de pH conforme Tabela 11). Os tubos foram novamente incubados, durante 20 minutos, nas mesmas temperaturas da pré-incubação e em seguida foram colocados em banho de gelo. Posteriormente, seguiram para a reação de coloração por Somogyi-Nelson (item 3.5) para a determinação da atividade enzimática (Whitaker, 1994, com modificações).

Tabela 11 – Condições de reação para determinação da temperatura ótima.

<b>Substratos (padrões)</b>	<b>Enzimas<sup>a</sup> (mg/mL)</b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>
rutina	H (0,02)	3,8	20/30/40/50
rutina	N (0,02)	4,0	20/30/40/50
rutina	Gli (0,02)	4,0	20/30/35/40
kaempferol <sup>b</sup>	Ga (0,07)	4,5	10/20/30/40

<sup>a</sup>H-hesperidinase, N-naringinase, Gli-glicosidase, Ga-β-galactosidase.

<sup>b</sup>kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.

pH adotado conforme orientação do fabricante.

Para a determinação do pH ótimo, 4,0 mL da solução dos substratos rutina ou kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo (10 mg/mL em tampão acetato 0,05 M pH 5,0) foram adicionados aos tubos previamente identificados. Os tubos foram pré-incubados (temperaturas conforme Tabela 12) e em seguida, foram adicionados de 1,0 mL de solução enzimática (em diferentes valores de pH, conforme Tabela 12). Os tubos foram novamente incubados (mesmos valores de temperatura da pré-incubação) durante 20 minutos e em seguida foram colocados em banho de gelo. Posteriormente, seguiram para a reação de coloração por Somogyi-Nelson (item 3.5) para a determinação da atividade enzimática (Whitaker, 1994, com modificações).

Tabela 12 – Condições de reação para determinação do pH ótimo.

<b>Substratos (padrões)</b>	<b>Enzimas<sup>a</sup> (mg/mL)</b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>
rutina	H (0,02)	2,0/3,0/3,8/4,0/5,0	40
rutina	N (0,02)	2,0/3,0/3,8/4,0/5,0	40
rutina	Gli (0,02)	2,0/3,0/3,8/4,0/5,0	37
kaempferol <sup>b</sup>	Ga (0,07)	3,0/4,0/4,5/5,0/6,0	30

<sup>a</sup>H-hesperidinase, N-naringinase, Gli-glicosidase, Ga-β-galactosidase.

<sup>b</sup>kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.

temperatura adotada conforme orientação do fabricante.

### 3.7 - Reação de biotransformação utilizando as matrizes alimentares

Aos substratos chá mate, chá verde e sucos de laranja e limão foram adicionadas as enzimas que poderiam atuar sobre os flavonóides encontrados em cada uma dessas amostras, conforme composição descrita na literatura. Aos chás foram adicionadas as enzimas hesperidinase, β-galactosidase e a combinação entre elas. Aos sucos foram adicionadas as enzimas hesperidinase, naringinase, glicosidase e as combinações entre elas.

As reações de biotransformação foram realizadas em incubadora com controle de temperatura e agitação de 130 rpm, durante 4 horas, utilizando 100 mL de chás ou sucos e 1 mL das soluções enzimáticas preparadas em tampão acetato 0,1 M, segundo as condições descritas na Tabela 13.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à liofilização e armazenadas em recipientes separados e identificados em freezer (-14°C a -18°C) para garantir a integridade até a realização de todos os testes.

Tabela 13 – Diferentes condições de reação (concentração de enzima, pH e temperatura) adotadas para as reações de biotransformação.

<b>Substratos</b>	<b>Concentrações enzimáticas (mg/mL)<sup>a</sup></b>	<b>pH</b>	<b>T (°C)</b>
chá mate	H 0,02	3,8	40,0
	Ga 0,07	4,5	30,0
	H 0,02+ Ga 0,07	4,1	35,0
chá verde	H 0,02	3,8	40,0
	Ga 0,07	4,5	30,0
	H 0,02+ Ga 0,07	4,1	35,0
suco de laranja	H 0,02	3,8	40,0
	N 0,02	4,0	40,0
	Gli 0,02	4,0	37,0
	H 0,02 + N 0,02 + Gli 0,02	3,9	37,5
suco de limão	H 0,02	3,8	40,0
	N 0,02	4,0	40,0
	H 0,02 + N 0,02 + Gli 0,02	3,9	37,5

<sup>a</sup>H-hesperidinase, N-naringinase, Gli-glicosidase e Ga-β-galactosidase.

### 3.8 - Extração dos flavonóides totais

A massa do liofilizado correspondente a 10 mL para cada amostra (chás e sucos, item 3.1) foi pesada e utilizada para a extração dos flavonóides antes da realização dos testes de capacidade antioxidante.

Às amostras foram adicionados 40 mL de álcool metílico 50%. Este material foi homogeneizado e deixado em repouso por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após o repouso, o material foi centrifugado a 13.000 rpm, 22°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. Ao resíduo da primeira extração foram adicionados 40 mL de acetona 70%, sendo homogeneizados e deixados em repouso por mais 60 minutos, à temperatura ambiente. Novamente o material passou pela centrifugação e o sobrenadante foi transferido para o mesmo balão volumétrico de 100 mL.

O balão que continha os extratos teve o seu volume completado para 100 mL com água destilada (Rufino *et al.*, 2006) e o extrato foi utilizado para os testes de capacidade antioxidante FRAP, DPPH e  $\beta$ -caroteno.

### **3.9 - Avaliação da capacidade antioxidante**

#### **3.9.1 - Método de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para ser realizado o teste TBARS, que tem por objetivo quantificar os produtos secundários da lipoperoxidação (LPO), em especial o malondialdeído, um dos tipos de aldeído que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), utilizou-se como fonte de lipídios a gema de ovo.

Para cada teste, a 1,0 g de gema de ovo foi adicionado 1,0 mL da amostra a ser testada (chá mate, chá verde, suco de laranja ou suco de limão, item 3.1) e 0,5 mL de  $H_2O_2$ , a fim de induzir dano oxidativo. O material foi homogeneizado com 5,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 em vórtex e ultra-som. Em seguida, 250  $\mu$ L do homogenato de cada amostra foram adicionados a outros tubos previamente identificados. A esses todos foram acrescentados 25  $\mu$ L de BHT 4% metanólico, sendo homogeneizados novamente em vórtex. Posteriormente foram adicionados 1,0 mL de ácido acético 12%, 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e 750  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,4, sendo armazenados em banho-maria durante 60 minutos a 100°C. O material retirado do banho-maria foi colocado em banho de gelo, e em seguida foram adicionados 1,5 mL de N-butanol; o material foi novamente homogeneizado em vórtex e centrifugado por 10 minutos a 5.000 rpm. A leitura da fase orgânica foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. A amostra controle (gema de ovo e peróxido de hidrogênio) seguiu o mesmo procedimento.

A curva padrão utilizada foi a de tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações de 0 a 0,007 mg de TEP (Ohkawa, 1979; Silva, 2007) e o experimento foi realizado em triplicata.

### **3.9.2 - Método do poder antioxidante de redução do ferro – “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP)**

Segundo o procedimento descrito por Rufino *et al.* (2006) o método FRAP baseia-se na redução, a baixo valor de pH, de  $\text{Fe}^{+3}$ -tripiridiltriazina ao complexo  $\text{Fe}^{+2}$ -tripiridiltriazina de coloração azul, na presença do reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium (TPTZ), por redutores no caso os antioxidantes das amostras. A mudança de cor é monitorada pela leitura da absorbância a 595 nm.

A partir do extrato obtido (item 3.8) foram preparadas, em tubos de ensaio, três diluições diferentes (5:5, 1:9 e 9:1 mL de extrato/mL de água destilada). Em ambiente escuro, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de cada diluição a outro tubo de ensaio contendo 270  $\mu\text{L}$  de água destilada. A essa mistura, foram acrescentados 2,7 mL do reagente FRAP [tampão acetato 0,3 M pH 3,6; TPTZ (2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium) 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM]. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e mantidos em banho-maria a 37°C durante 30 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis a 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco para a calibração do equipamento.

Os valores foram obtidos comparando as leituras encontradas com a curva padrão de sulfato ferroso (0-2000  $\mu\text{M}$ ). O valor final foi expresso em  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de amostra e o experimento foi realizado em triplicata.

### **3.9.3 - Método de seqüestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)**

Segundo Faria *et al.* (2005), o método DPPH é baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis de coloração violeta, que quando reduzido passa a ter coloração amarelada. Quando ocorre a adição de uma substância antioxidante ao meio, capaz de ceder elétron neutralizando esse radical livre, ocorre o decréscimo da absorbância a 517 nm.

As determinações foram realizadas adicionando-se em cada eppendorf 250  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de DPPH (20 mg/mL) e 40  $\mu\text{L}$  de metanol (controle), ou o mesmo volume do extrato a ser analisado (item 3.8). Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca, em três diluições diferentes (5:5, 1:9 e 9:1 mL de extrato/mL de água destilada), no comprimento de onda de 517 nm, após 25 minutos de incubação a 25°C.

A curva padrão realizada continha DPPH nas concentrações de 10 a 60 µM e o álcool metílico foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

O decaimento da absorbância das amostras (A<sub>am</sub>) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (A<sub>c</sub>), resultou na porcentagem de seqüestro de radicais livres (% SRL), que foi expressa através da equação:

$$\% \text{ SRL} = \frac{(A_c - A_{am})}{A_c} \times 100$$

O experimento foi realizado em triplicata.

#### **3.9.4 - Método de oxidação do β-caroteno/ácido linoléico**

De acordo com Duarte-Almeida *et al.* (2006), o método do β-caroteno/ácido linoléico foi desenvolvido baseado na descoloração do β-caroteno (solução de cor amarela), através da sua oxidação, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico quando em contato com agentes oxidantes. A determinação deve ser efetuada a 470 nm, na presença e na ausência de um antioxidante. A atividade antioxidante é avaliada pela capacidade dos antioxidantes das amostras em diminuir a velocidade de oxidação que leva ao desaparecimento da coloração produzida pelo β-caroteno do sistema.

Para o preparo da mistura reativa, foram adicionados a um erlenmeyer, 20 µL de ácido linoléico; 200 mg de tween 40; 25 µL de solução de β-caroteno a 2,0 mg/mL em clorofórmio e 500 µL de clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio sob nitrogênio. A esta mistura isenta de clorofórmio, foram adicionados 25 mL de água previamente saturada com oxigênio. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da mistura reativa e 10 µL do extrato (item 3.8) ou de metanol, no caso da amostra controle. A placa foi incubada a 45°C (aproximadamente 2 minutos) para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descolorimento do β-caroteno. As leituras foram realizadas para a absorbância inicial e para a absorbância final (após duas horas) em espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda de 470 nm. A queda da absorbância das amostras (A<sub>am</sub>) foi correlacionada com a queda da absorbância do controle (A<sub>c</sub>), obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) através da equação:

$$Ac = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$Aam = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$\% I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100$$

O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.9.5 - Método da capacidade de absorção de radicais oxigênio – “Oxygen Radical Absorbance Capacity” (ORAC)

Segundo Ginny Bank & Alex Schauss (2004), o ORAC, ensaio simples e sensível, refere-se à análise da capacidade do antioxidante em proteger um substrato, no caso, a fluoresceína do ataque de radicais peróxil que são gerados por uma fonte radicalar 2,2-azobis amidinopropano (AAPH), à 37°C.

A capacidade antioxidante dos extratos liofilizados foi avaliada utilizando-se o ensaio ORAC<sub>FL</sub> com fluoresceína como fluorescente e AAPH (2,2-azobis amidinopropano) como fonte de radical livre. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Prior *et al.* (2003) e Ou *et al.* (2001) com modificações (Salvador *et al.*, 2006).

Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos (50 mg/mL) em tampão fosfato 75 mM (pH 7,2)/DMSO (99:1) e diluídas 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 vezes com o tampão fosfato. O Trolox<sup>®</sup>, substância de referência, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico - análogo da vitamina E) foi analisado nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µM, empregando-se o mesmo sistema diluente. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação λ=485 nm e emissão λ=528 nm) em leitor de microplaca Biotek Synerg-2 monitorando a cinética de reação a cada 2 minutos por um período de 70 minutos (temperatura = 37°C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox<sup>®</sup> equivalente (TE) por grama de extrato liofilizado em base seca (µmol de TE/g). Como controle positivo utilizou-se ácido cafeico, ácido clorogênico, quercetina e isoquercetina e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.10 - Quantificação dos compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu

O reativo de Folin-Ciocalteu<sup>®</sup> (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) quando na presença de compostos fenólicos, muda a sua coloração de amarelo para azul, sendo que a intensidade da cor se correlaciona com a quantidade de fenóis na sua constituição (Singleton *et al.*, 1999). Isso acontece, pois, os fenóis contidos nas amostras são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação do  $O_2^-$ , o qual reage com os ácidos originando a coloração azul. Apesar da química do ensaio Folin-Ciocalteu ainda não estar bem definida, ele é conveniente, pois se trata de um ensaio simples e reprodutível (Tomei & Salvador, 2007).

Para a realização do procedimento, foram dissolvidos 100 g de carbonato de sódio e 6,0 g de tartarato de sódio em quantidade suficiente para 500 mL de água fervente. Após o resfriamento da solução (a temperatura ambiente), foram adicionados 750  $\mu$ L desta solução em cada tubo, contendo 3 mL da amostra a ser analisada (preparada conforme item 3.1). A eles foram adicionados 75  $\mu$ L do reagente Folin-Ciocalteu<sup>®</sup>, que em seguida foram incubados a 20°C durante 30 minutos. As absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 700 nm. Para a confecção do branco, o procedimento foi o mesmo, porém, ao invés da solução contendo as amostras, foi acrescentada apenas a solução de carbonato e tartarato de sódio. A curva padrão foi confeccionada com ácido gálico de 0,0 a 500 mg/L (Singleton *et al.*, 1999, com modificações).

### 3.11 - Quantificação dos flavonóides totais

Para a realização do teste foram adicionados em cada tubo, previamente identificado, 1,0 mL de água destilada. A eles foram acrescentados 250  $\mu$ L da amostra a ser analisada (chás mate, verde e sucos de laranja e limão, item 3.1), 750  $\mu$ L de  $NaNO_2$  a 5%, 75  $\mu$ L de  $AlCl_3$  a 10% e 0,5 mL de NaOH 1,0 M. O material foi deixado em repouso (a temperatura ambiente) e a absorbância foi lida após 6 minutos a 510 nm. A curva padrão utilizada para os cálculos foi a de quercetina em concentrações que variaram de 5,0 a 75  $\mu$ g/mL (Tsai *et al.*, 2008).

### **3.12 - Caracterização química das amostras por espectrometria de massas**

Como forma de verificar se realmente as enzimas glicosidases atuaram sob os substratos estudados, foi realizada uma análise qualitativa pelo método ESI-MS (eletrospray ionization - modo negativo) em espectrômetro de massa, no laboratório de espectrometria de massas ThoMSon da Unicamp. As análises foram realizadas antes e após a biotransformação das amostras liofilizadas e reconstituídas com água.

O modo de análise utilizado para todas as amostras foi o negativo, pois, para gerar as cargas nas moléculas dos flavonóides (moléculas em geral ácidas) foi utilizado hidróxido de amônio. A necessidade de gerar as cargas para a análise por MS existe, pois, o espectrômetro de massas realiza leitura apenas de moléculas carregadas positiva ou negativamente.

A limpeza do equipamento foi realizada utilizando uma solução de metanol/água adicionada de hidróxido de amônio a 0,1%, a fim de retirar os possíveis interferentes. Posteriormente, o equipamento foi calibrado com solução de ácido fórmico a 0,1%.

Foram pesados 50 mg de cada amostra (antes e após biotransformação) sendo homogeneizadas a 1,0 mL da mistura de álcool metílico e água 1:1. O material foi filtrado e diluído na proporção de 10 µL da solução filtrada em 990 µL da solução preparada de metanol/água 1:1 adicionada de hidróxido de amônio a 0,1%. As amostras foram analisadas por injeções de fluxo de 10 µL/minuto, considerando uma faixa de massas para análise de 100 a 1000 u.

Os flavonóides padrões rutina e hesperidina também foram analisados por espectrometria de massas pelo método MS/MS, utilizando-se os mesmos reagentes e considerando o mesmo fluxo e faixa de massas utilizadas para a análise das amostras.

### **3.13 - Análise estatística**

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As médias entre o controle e as amostras foram comparadas pelo método estatístico t-student. Para a comparação entre as amostras foi realizado teste F seguido do teste T não pareado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Atividade enzimática na hidrólise de flavonóides glicosilados

A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.5. A Tabela 14 reporta os valores obtidos nas condições (temperatura e pH) especificadas pelo fabricante. De acordo com esses valores, para a temperatura e o pH, as enzimas que demonstraram maior atividade enzimática foram a glicosidase e a  $\beta$ -galactosidase, apresentando maior formação de açúcar redutor por minuto.

Tabela 14 - Atividade enzimática de hidrólise dos flavonóides glicosilados.

Enzimas	Substratos (padrões)	U ( $\mu$ mol de açúcar redutor formado/minuto)
hesperidinase	rutina	0,19 $\pm$ 0,02
naringinase	rutina	0,24 $\pm$ 0,01
glicosidase	rutina	0,46 $\pm$ 0,02
$\beta$ -galactosidase	kaempferol <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,01

<sup>a</sup>kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.

Segundo as condições utilizadas no trabalho, as atividades enzimáticas foram definidas como:

- 1 U de hesperidinase de *Penicillium* sp libera 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor (glicose) da molécula por minuto a 40°C em pH 3,8.
- 1 U de naringinase de *Penicillium decubens* libera 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor (glicose) por minuto a 40°C em pH 4,0.
- 1 U de glicosidase de *Aspergillus niger* libera 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor (glicose) por minuto a 37°C em pH 4,0.
- 1 U de  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* libera 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor (galactose) por minuto a 30°C em pH 4,5.

## 4.2 - Efeito da temperatura na atividade das enzimas

A determinação da temperatura ótima de reação das enzimas foi realizada conforme descrito no item 3.6.

As Figuras 9, 10, 11 e 12 representam os valores da atividade enzimática utilizando as enzimas hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase frente aos diferentes substratos conforme descrito no item 3.6.

As enzimas hesperidinase e naringinase, ambas pertencentes à família das ramnosidas, apresentaram o mesmo valor de temperatura ótima, 40°C. Em contrapartida as enzimas glicosidase e  $\beta$ -galactosidase apresentaram valores de temperatura ótima de 37°C e 30°C respectivamente. A  $\beta$ -galactosidase foi a enzima que manifestou maior termoresistência, uma vez que manteve 90% de sua atividade a 50°C.

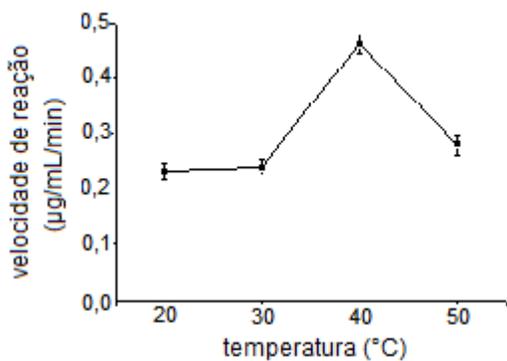


Figura 9 – Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da hesperidinase na hidrólise do substrato rutina.

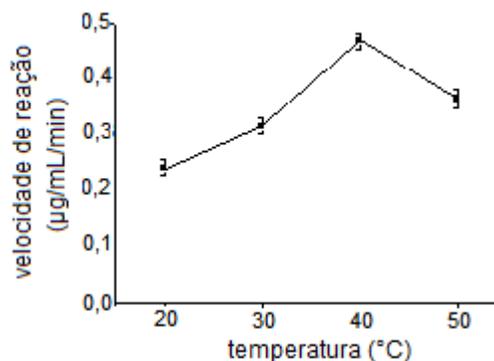


Figura 10 – Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da naringinase na hidrólise do substrato rutina.

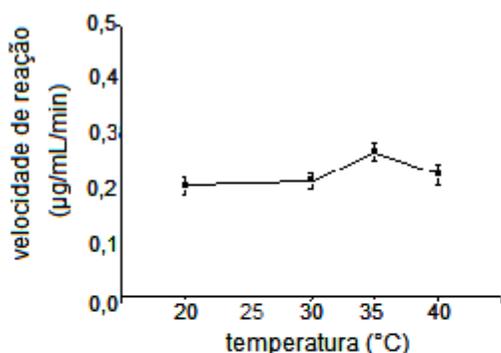


Figura 11 – Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da glicosidase na hidrólise do substrato rutina.

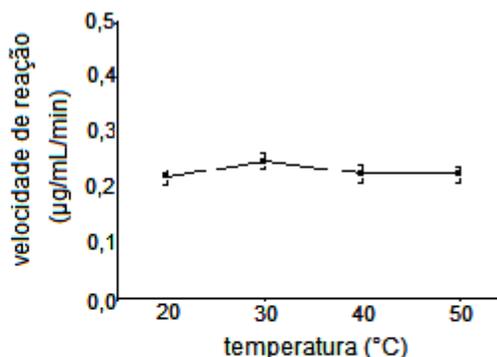


Figura 12 – Efeito da temperatura da reação na atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise do substrato kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.

Estudo anterior de cinética enzimática, descritos para a hesperidinase, mostrou que a faixa de temperatura ótima era de 50°C a 60°C (Miyake & Yumoto, 1999).

Por outro lado, para a naringinase de *Aspergillus niger*, definiu-se como temperatura ótima 50°C, sendo que a 40°C a enzima perdeu apenas 5% de sua atividade máxima. Porém, a atividade reduziu fortemente a temperaturas superiores ou iguais a 60°C (Puri & Kalra, 2005).

A temperatura ideal encontrada por Dhake & Patil (2007), para a glicosidase de *Penicillium purpurogenum* foi de 50°C, embora a enzima tenha apresentado estabilidade na faixa de 30°C a 65°C.

Outro estudo de cinética enzimática, dessa vez para a  $\beta$ -galactosidase de *Bacterium* PD 1, determinou a temperatura ótima dessa enzima como sendo 55°C. A enzima se mostrou estável até 60°C, porém, acima de 70°C a atividade caiu consideravelmente. A faixa de temperatura testada no estudo variou de 40°C a 80°C (Nakkharat *et al.*, 2008).

Embora os resultados encontrados neste trabalho não tenham correspondido exatamente aos valores dos estudos anteriores, foram próximos e corresponderam aos valores de temperatura indicados pelo fabricante Sigma-Aldrich, fato que está relacionado à origem de diferentes microrganismos para as enzimas estudadas.

### 4.3 - Efeito do pH na atividade das enzimas

A determinação do pH ótimo das enzimas foi realizada conforme descrito no item 3.6. As Figuras 13, 14, 15 e 16 representam os valores de atividade enzimática utilizando as enzimas hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase frente aos diferentes substratos conforme descrito no item 3.6.

As quatro enzimas apresentaram maior atividade em valores de pH levemente ácidos (faixa de 3,8 a 4,5), conforme relatado pelo fabricante. Valores de pH superiores a 4,5 causaram significativa redução na atividade de todas as enzimas testadas.

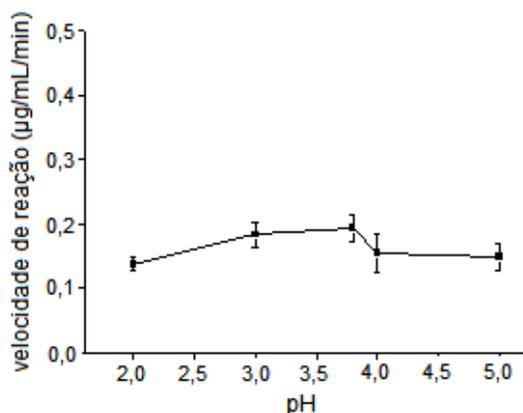


Figura 13 – Efeito do pH da reação na atividade enzimática da hesperidinase na hidrólise do substrato rutina.

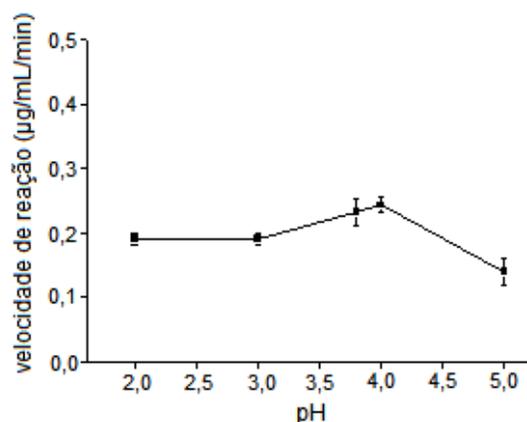


Figura 14 – Efeito do pH da reação na atividade enzimática da naringinase na hidrólise do substrato rutina.

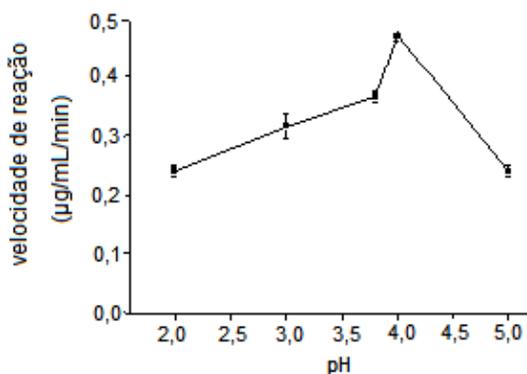


Figura 15 – Efeito do pH da reação na atividade enzimática da glicosidase na hidrólise do substrato rutina.

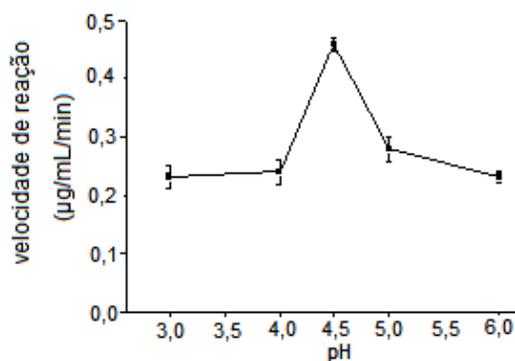


Figura 16 – Efeito do pH da reação na atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase na hidrólise do substrato kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo.

Conforme reportado na literatura, estudo anterior de cinética enzimática para a hesperidinaze definiu como faixa de pH ideal para essa enzima valores entre 3,0-4,0. Nesse estudo, Miyake & Yumoto (1999), testaram faixa de pH variando entre 3,0-7,0.

Puri & Kalra (2005) determinaram o pH ótimo da naringinase de *Aspergillus niger* purificada e este valor foi definido como sendo de pH 4,0; embora de 3,0 a 5,0 a atividade tenha reduzido em apenas 14% da atividade enzimática máxima.

Para a definição do pH ideal da glicosidase, Dhake & Patil (2007), utilizaram uma faixa de pH que variou de 3,0 a 7,0 para a glicosidase de *Penicillium purpurogenum*. O pH ótimo encontrado foi de 5,5; sendo que a enzima foi razoavelmente estável a baixos valores de pH.

Outro estudo de cinética enzimática determinou que o pH ótimo de atuação da  $\beta$ -galactosidase de *Bacterium* PD 1, foi de 6,5. A faixa de pH testada foi de 3,0 a 10,0. No entanto a enzima foi estável em pH de 6,0 a 10,0, mantendo mais de 80% da sua atividade (Nakkharat *et al.*, 2008).

Os estudos descritos mostraram valores de pH próximos aos utilizados pelo presente trabalho, embora, muitas vezes, esses valores não sejam exatamente correspondentes. No geral, as condições de reação adotadas para a biotransformação das amostras, neste trabalho, estão de acordo com testes descritos na literatura (Monti *et al.*, 2004; Soria, *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 1999; Dhake & Patil, 2005) e com as orientações do fabricante Sigma-Aldrich.

## 4.4 - Caracterização das amostras

### 4.4.1 - Quantificação dos polifenóis e dos flavonóides totais

A quantificação dos compostos polifenólicos e dos flavonóides totais foi realizada conforme descrito nos itens 3.10 e 3.11.

Conforme Tabela 15, o chá verde apresentou mais polifenóis e flavonóides que o chá mate e o suco de laranja apresentou concentrações desses compostos mais elevadas que as apresentadas pelo suco de limão.

Tabela 15 – Polifenóis e flavonóides totais das amostras de chá mate, verde e sucos de laranja e limão antes da reação de biotransformação.

<b>Amostra</b>	<b>Polifenóis totais<sup>a</sup> (mg/g de chá ou mg/100 mL de suco)</b>	<b>Flavonóides totais<sup>b</sup> (mg/g de chá ou mg/100 mL de suco)</b>
chá mate	87,01 ± 1,20	75,50 ± 0,50
chá verde	104,09 ± 2,30	80,30 ± 1,10
suco de laranja	101,10 ± 0,50	51,20 ± 0,02
suco de limão	100,12 ± 0,10	10,10 ± 0,01

Média ± desvio padrão.

<sup>a</sup>mg de equivalentes de ácido gálico/g de chá *in natura* ou 100 mL de suco.

<sup>b</sup>mg de equivalentes de quercetina/g de chá *in natura* ou 100 mL de suco.

Na literatura, os valores quantificados de polifenóis e flavonóides para o chá mate foram de 100 mg/grama de extrato e de 170 mg/grama de extrato, respectivamente, conforme estudo de Tsai *et al.* (2008). Os mesmos autores, ao quantificar os polifenóis do chá verde, encontraram 150 mg/grama de extrato e 75 mg/grama de flavonóides no extrato. Faller & Fialho (2009) ao estudarem a composição da laranja e quantificarem os seus polifenóis encontraram 114,6 ± 1,3 mg/100 gramas de peso fresco; Ghafar *et al.* (2010) encontraram 135,3 mg/100 mL de suco. Com relação aos flavonóides, foram quantificados 51,8 mg/100 mL, segundo estudo de Vallejo *et al.* (2010). No caso da quantificação dos polifenóis do limão, segundo Ghafar *et al.*

(2010), foram encontrados 211,70 mg/100 mL de suco e  $10,67 \pm 0,27$  mg/100 mL de flavonóides totais.

Os dados encontrados nesse estudo são condizentes com os reportados na literatura, no entanto, é possível uma variação nos componentes quando comparados os dados desse trabalho com a literatura ou mesmo quando é realizada uma comparação entre literaturas, pois, por se tratarem de amostras naturais, essas podem sofrer alterações na composição de acordo com a forma de cultivo, com o tipo de solo, com o clima do local ou quanto à forma de armazenamento, dentre outros fatores.

A influência dos compostos polifenólicos na capacidade antioxidante de cada matriz alimentar estudada foi avaliada por diversos ensaios antioxidantes.

#### **4.4.2 - Capacidade antioxidante**

##### **4.4.2.1 - Medida da peroxidação lipídica pelo índice de TBARS**

O teste para a avaliação da peroxidação lipídica *in vitro*, utilizando fosfolipídeos da gema de ovo como substrato, foi realizado segundo descrito no item 3.9.1.

A fim de garantir a validade do teste no que diz respeito à limitação ou redução do dano oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio, devido ao uso das matrizes alimentares com poder antioxidante, inicialmente foi avaliado o nível de lipoperoxidação da gema de ovo isolada e da gema de ovo adicionada de peróxido de hidrogênio.

Conforme esperado, o dano oxidativo na amostra de gema de ovo adicionada de peróxido de hidrogênio foi mais elevado, comprovando que o  $H_2O_2$  é capaz de induzir dano. Em seguida, foi avaliado o poder antioxidante de cada matriz alimentar estudada sob a amostra de gema de ovo adicionada de peróxido de hidrogênio.

Os teores de malondialdeído (mg/g amostra), produto secundário da peroxidação lipídica, da gema de ovo oxidada com  $H_2O_2$  e previamente tratada com o chá mate, verde e sucos de laranja e limão foram significativamente reduzidos quando comparados à amostra sem o tratamento com as matrizes alimentares.

Ao comparar o desempenho entre os chás e os sucos, percebe-se um desempenho significativamente superior do chá verde (Tabela 16). Entretanto não houve diferença significativa entre o chá mate e os sucos.

Tabela 16 – Índice de TBARS (mg) por grama das amostras de chá mate, verde e sucos de laranja e limão liofilizados e reconstituídos com água.

<b>Amostra</b>	<b>Malondialdeído (mg/g amostra) (x10<sup>-3</sup>)</b>
gema de ovo + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (controle)	10,0 ± 1,6
gema de ovo + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + chá mate	8,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>
gema de ovo + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + chá verde	5,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
gema de ovo + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + suco de laranja	6,9 ± 0,6 <sup>ab</sup>
gema de ovo + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + suco de limão	6,9 ± 0,1 <sup>ab</sup>

Média ± desvio padrão.

<sup>a</sup>p < 0,05 comparado ao controle.

<sup>b</sup>p < 0,05 comparado ao tratamento com chá verde.

Um estudo realizado em 2007 com o intuito de avaliar a lipoperoxidação em homogeneizados de gema de ovo, utilizando produto seco por spray-drying de *Ilex paraguariensis*, apresentou bons resultados, fornecendo subsídios, com relação à técnica, para a realização do presente estudo. No entanto, resultados consistentes na literatura que tenham tido como base o uso do índice de TBARS *in vitro* para avaliação da lipoperoxidação em gema de ovo, utilizando bebidas brasileiras naturais, não foram encontrados (Silva, 2007).

#### **4.5 - Influência da biotransformação na capacidade antioxidante das amostras**

Após a biotransformação e a extração dos flavonóides totais, as amostras de chás e sucos, antes e após biotransformação, foram analisadas pelos diferentes métodos antioxidantes (FRAP, DPPH, β-caroteno e ORAC) conforme descrito nos itens 3.9.2 à 3.9.5. Os resultados dos ensaios FRAP, DPPH e β-caroteno estão apresentados nas Figuras 17, 18, 19 e 20 para os chás mate e verde, sucos de laranja e limão, respectivamente.

A interpretação dos resultados da capacidade antioxidante pelo teste FRAP depende da coloração azul escura produzida após a redução do íon ferro de Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup>, devido à presença de compostos antioxidantes nas amostras avaliadas. Portanto, quanto maior a capacidade antioxidante dos compostos encontrados nas matrizes alimentares estudadas, maior será a

redução do íon ferro e, portanto, maior a coloração azul produzida e identificada pelo espectrofotômetro.

No teste  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico a interpretação da capacidade antioxidante depende da perda da coloração amarelo-alaranjada do reagente  $\beta$ -caroteno em contato com os produtos da oxidação do ácido linoléico. Os antioxidantes das amostras estudadas podem limitar ou reduzir essa oxidação o que provocaria uma menor perda de coloração identificada pelo espectrofotômetro.

Conforme resultados encontrados, as amostras de chás e sucos após a biotransformação, em todas as condições enzimáticas testadas, avaliadas pelos métodos FRAP e  $\beta$ -caroteno, mostraram aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da atividade antioxidante quando comparadas às amostras controle (antes da biotransformação), ou seja, polifenóis biotransformados apresentam maior atividade antioxidante quando comparados aos altamente glicosilados.

A interpretação dos resultados da capacidade antioxidante pelo método DPPH depende da perda da coloração violeta desse reagente ao ser neutralizado pelos antioxidantes presentes na amostra analisada. Portanto, quanto maior a capacidade antioxidante dos compostos encontrados nas amostras estudadas, maior será a neutralização do reagente DPPH e, portanto, maior será a perda da coloração violeta identificada pelo espectrofotômetro.

Neste ensaio foi observado aumento significativo na capacidade antioxidante do chá mate e do suco de limão, independente do tratamento enzimático empregado. Com relação ao suco de laranja, a associação das enzimas hesperidinase/naringinase/glicosidase não foi efetiva em elevar significativamente a capacidade antioxidante da amostra biotransformada quando comparada à amostra controle, no entanto, todas as outras amostras biotransformadas apresentaram bom desempenho. Contradizendo o que foi obtido pelos ensaios FRAP e  $\beta$ -caroteno, para o chá verde, os resultados obtidos com o ensaio DPPH, apesar de apontarem aumento na capacidade antioxidante das amostras biotransformadas, este não foi significativo quando comparado à amostra controle (antes da biotransformação). Após análise estatística das amostras das quatro matrizes alimentares estudadas, notou-se que não houve diferença significativa quanto ao emprego das diferentes enzimas numa mesma matriz, porém, salvo exceções já apresentadas, a maioria das amostras biotransformadas apresentou atividade antioxidante significativamente superior ao controle. As evidências mostram a importância de biotransformar as matrizes alimentares para se obter um potencial antioxidante superior, independente do tipo de enzima utilizada e se serão utilizadas isoladas ou em associação.

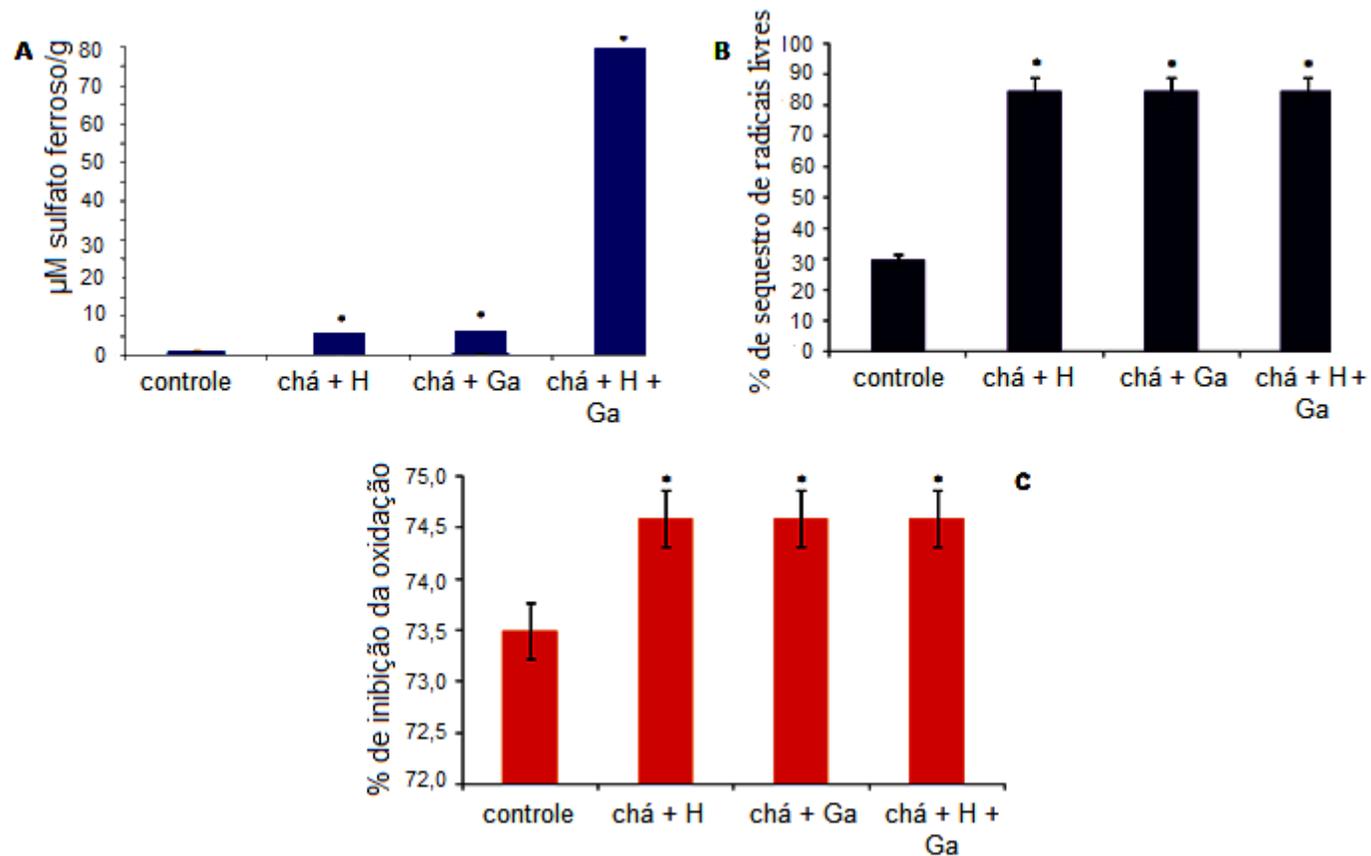


Figura 17 – Capacidade antioxidante do chá mate antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%). A comparação foi realizada entre o controle e as amostras biotransformadas (\* $p < 0,05$  quando comparado ao controle). H-hesperidinase e Ga- $\beta$ -galactosidase.

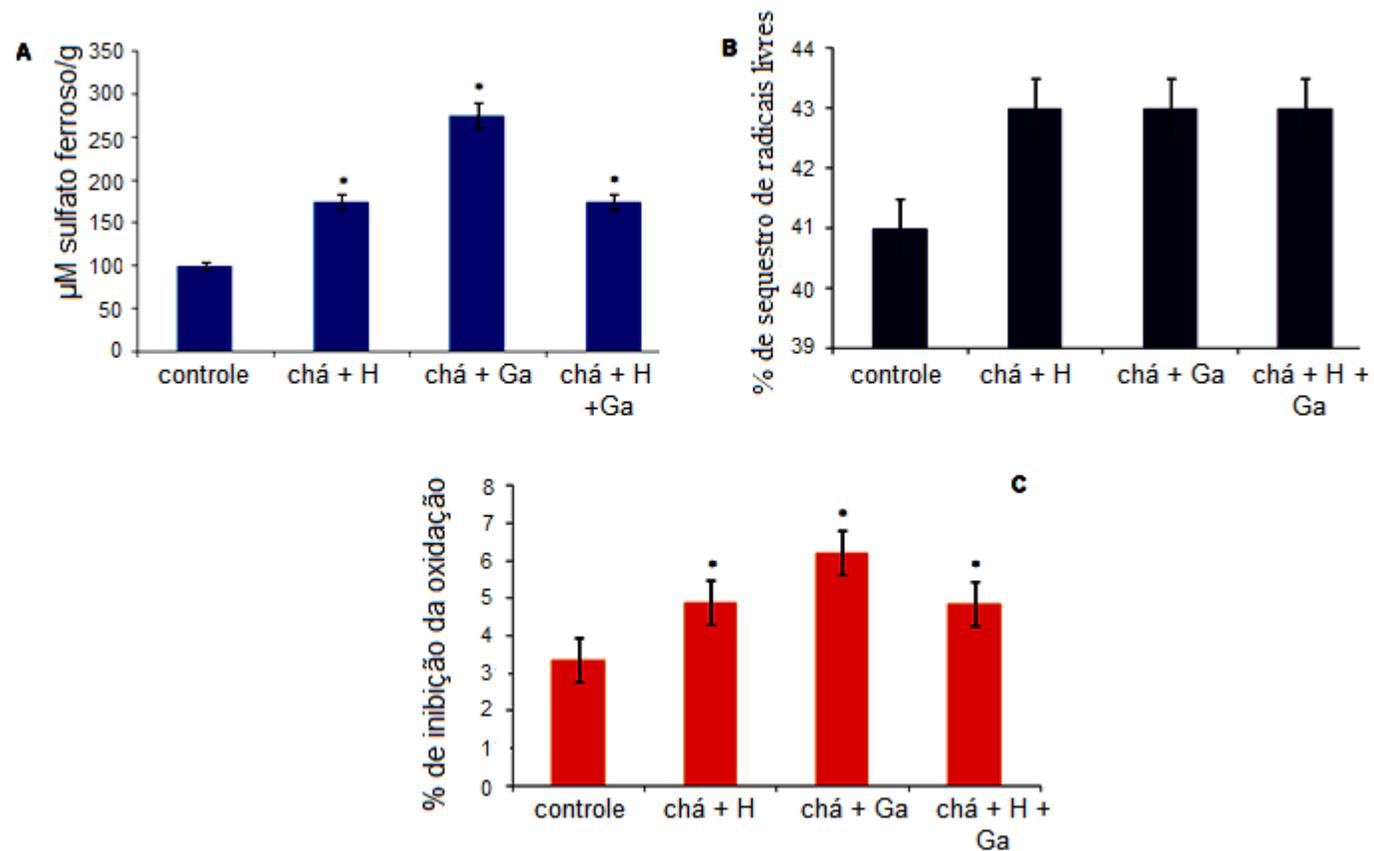


Figura 18 – Capacidade antioxidante do chá verde antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%). A comparação foi realizada entre o controle e as amostras biotransformadas (\* $p < 0,05$  quando comparado ao controle). H-hesperidinasase e Ga- $\beta$ -galactosidase.

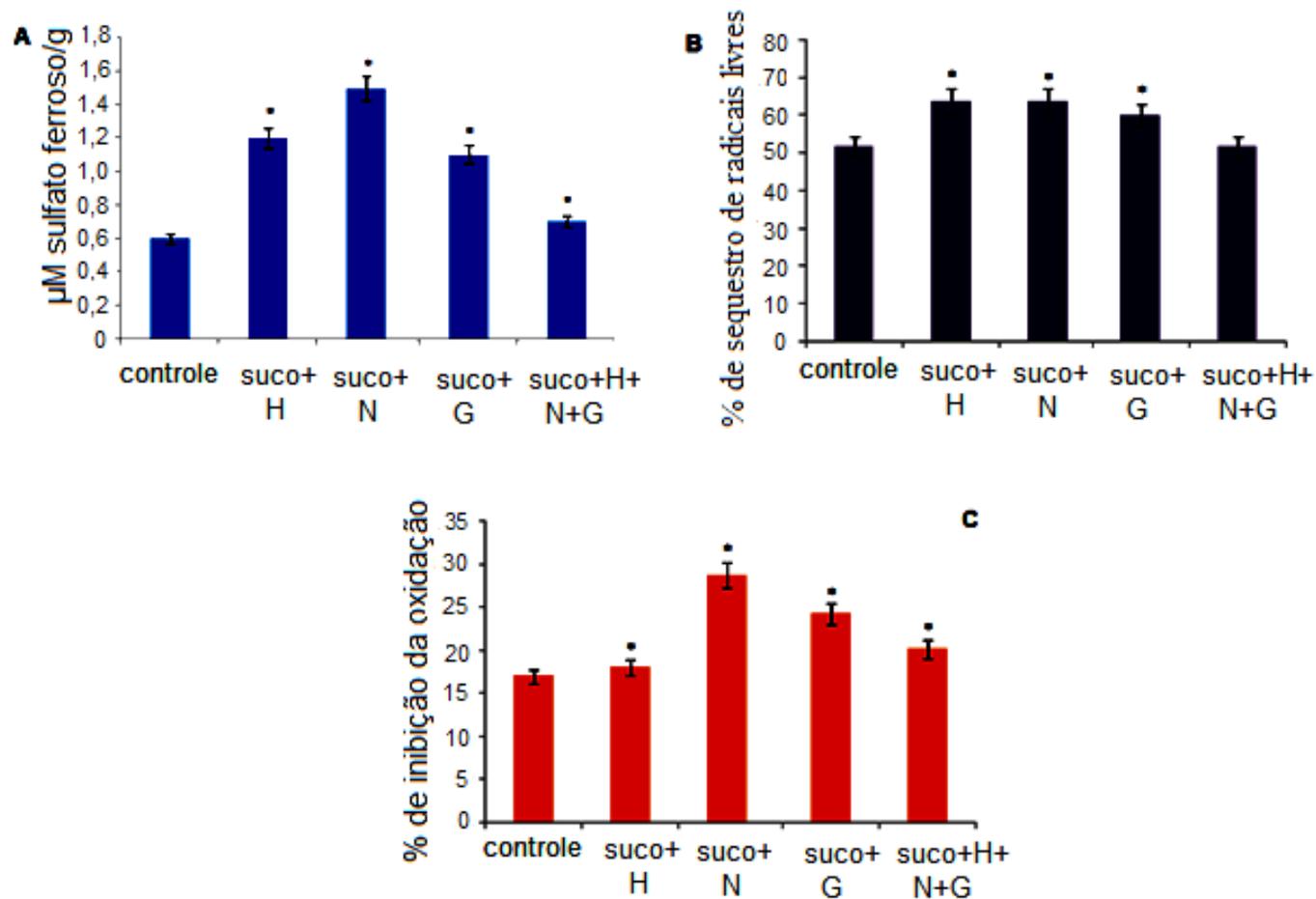


Figura 19 – Capacidade antioxidante do suco de laranja antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%). A comparação foi realizada entre o controle e as amostras biotransformadas (\* $p < 0,05$  quando comparado ao controle). H-hesperidinase, N-naringinase e G-glicosidase.

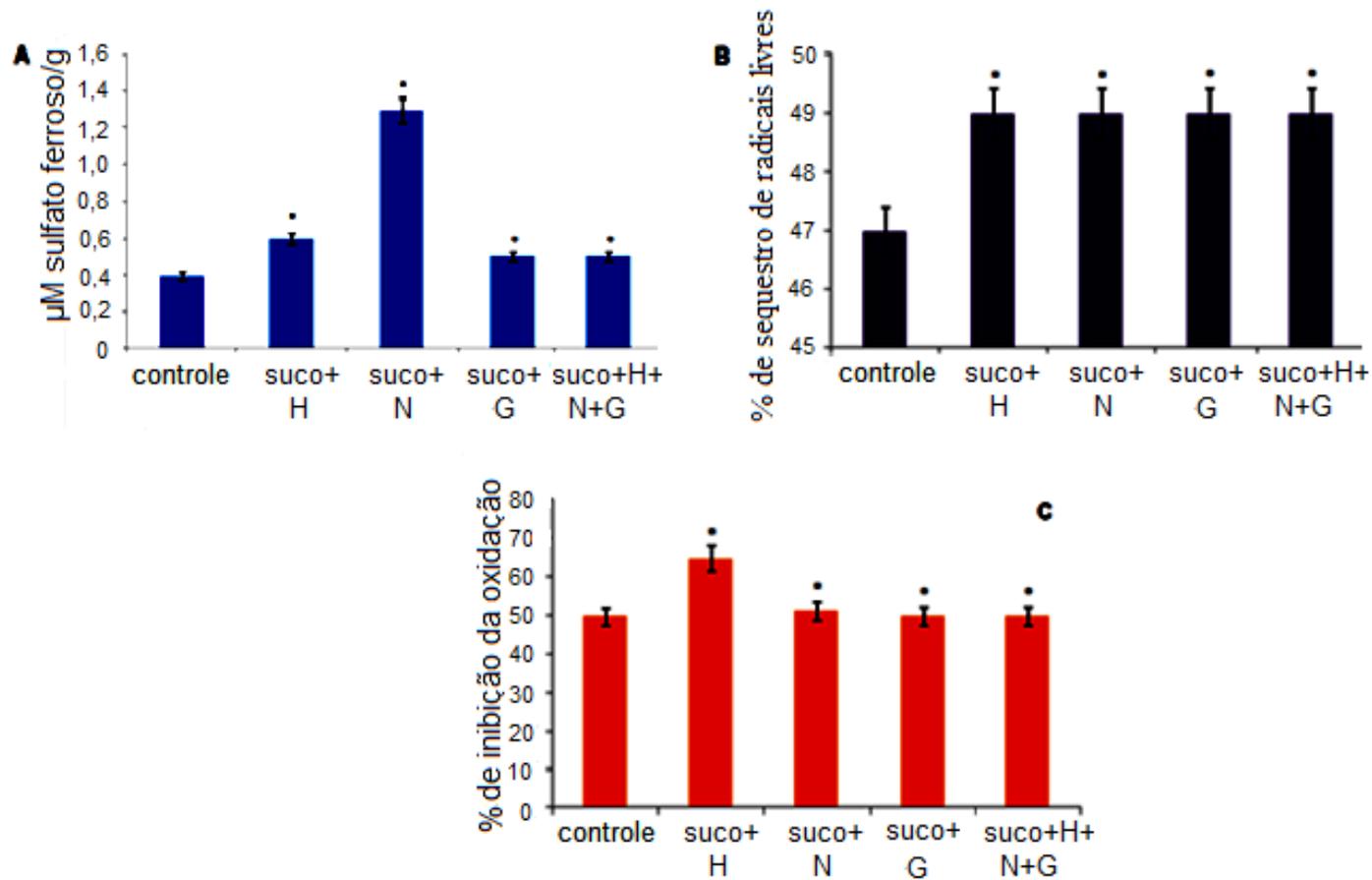


Figura 20 – Capacidade antioxidante do suco de limão antes (controle) e após a biotransformação avaliada pelos métodos A) FRAP ( $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g amostra liofilizada e reconstituída com água), B) DPPH (%) e C)  $\beta$ -caroteno (%). A comparação foi realizada entre o controle e as amostras biotransformadas (\* $p < 0,05$  quando comparado ao controle). H-hesperidina, N-naringina e G-glicosidase.

A fim de avaliar a atividade antioxidante das amostras biotransformadas que apresentaram resultados mais expressivos nos testes FRAP, DPPH e  $\beta$ -caroteno foi realizado o teste ORAC.

A interpretação dos resultados oferecidos pelo teste ORAC com relação à capacidade antioxidante depende da perda da fluorescência do reagente fluoresceína quando em contato com os produtos da oxidação do reagente AAPH. Os antioxidantes encontrados nas amostras estudadas podem impedir ou reduzir essa oxidação, reduzindo a perda da fluorescência da solução, identificada pela leitura em espectrofotômetro de fluorescência.

O ensaio comparou a atividade antioxidante do chá mate antes e após a biotransformação com a associação das enzimas hesperidinase e  $\beta$ -galactosidase; o chá verde antes e após a biotransformação com a enzima  $\beta$ -galactosidase; e os sucos de laranja e limão antes e após a biotransformação com a enzima naringinase. Os resultados podem ser conferidos na Tabela 17.

Tabela 17 – Ensaio ORAC para as amostras de chás mate, verde e sucos de laranja e limão *in natura* e biotransformados enzimaticamente.

<b>Amostra</b>	<b>Ensaio ORAC (<math>\mu\text{mol de TE g}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
chá mate não biotransformado	3447,36 $\pm$ 310, 26
chá mate + hesperidinase e $\beta$ -galactosidase	4092,18 $\pm$ 10,23
chá verde não biotransformado	3557,56 $\pm$ 183,21
chá verde + $\beta$ -galactosidase	4098,25 $\pm$ 30,74
suco de laranja não biotransformado	737,43 $\pm$ 20,21
suco de laranja + naringinase	1503,25 $\pm$ 76,67*
suco de limão não biotransformado	367,87 $\pm$ 4,82
suco de limão + naringinase	544,96 $\pm$ 24,09*

Média  $\pm$  desvio padrão. Equação de reta da curva padrão de Trolox<sup>®</sup>:  $y=2,0982x-0,3798$ ;  $R^2=0,9983$ .

<sup>a</sup>Os resultados foram expressos como micromols de Trolox<sup>®</sup> equivalente por grama de extrato liofilizado.

\*Os sucos de laranja e limão biotransformados apresentaram resultados significativamente superiores às matrizes alimentares antes da biotransformação.

Conforme os dados da Tabela 17, nota-se que mais uma vez as amostras biotransformadas, para todas as matrizes alimentares, apresentaram atividade antioxidante superior às apresentadas pelas amostras controle (sem a biotransformação). Vale destacar que para os sucos de laranja e limão a biotransformação permitiu praticamente duplicar os valores de  $\mu\text{mol}$  de Trolox<sup>®</sup> equivalente por grama de extrato liofilizado, quando comparados às amostras controle, confirmando que a biotransformação, nas condições de reação adotadas, foi eficiente e produziu um aumento expressivo da atividade antioxidante. Em trabalho recente Macedo *et al.* (2011) já haviam mostrado que a biotransformação é capaz de aumentar a atividade antioxidante, verificada pelo ensaio ORAC, em folhas secas de chá mate e verde. No entanto o estudo foi realizado com a enzima tanase de *Paecilomyces variotii*, o que permitiu abordar outro mecanismo de ação que não a desglicosilação.

Os padrões Sigma Aldrich de G-hesperidina, hesperidina, rutina e quercetina também foram comparados pelo ensaio ORAC. Os resultados podem ser conferidos na Tabela 18.

Tabela 18 – Ensaio ORAC para os padrões dos flavonóides G-hesperidina, hesperidina, rutina e quercetina.

<b>Amostra</b>	<b>Ensaio ORAC (<math>\mu\text{mol}</math> de TE <math>\text{g}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>
G-hesperidina	3,90 $\pm$ 0,05
hesperidina	4,73 $\pm$ 0,03*
rutina	4,76 $\pm$ 0,01
quercetina	6,39 $\pm$ 0,36*

Média  $\pm$  desvio padrão. Equação de reta da curva padrão de Trolox<sup>®</sup>:  $y=2,0982x-0,3798$ ;  $R^2=0,9983$ .

<sup>a</sup>Os resultados foram expressos como micromols de Trolox<sup>®</sup> equivalente por grama de substância.

\*Hesperidina e quercetina apresentaram valores de equivalente de Trolox<sup>®</sup> significativamente superiores aos resultados apresentados pela G-hesperidina e rutina respectivamente.

Os dados apresentados confirmaram o que foi verificado para as matrizes alimentares, flavonóides aglicona ou glicosilados, porém, menos complexos, apresentam atividade antioxidante superior às formas altamente glicosiladas. Isso pode ser comprovado na Tabela 18

onde a hesperidina e a quercetina apresentaram valores superiores às suas formas mais complexas como a G-hesperidina e a rutina respectivamente. Ou *et al.* (2001) por meio do ensaio ORAC já havia demonstrado que a atividade antioxidante da quercetina era superior a da rutina, sendo 7,28 e 6,01  $\mu\text{mol}$  de TE  $\text{g}^{-1}$  respectivamente.

Quanto à discordância de alguns resultados encontrados pelo teste DPPH com os encontrados pelos testes FRAP e  $\beta$ -caroteno, Castro-Gamboa & Pauletti (2004) já haviam descrito que o teste DPPH permite a obtenção de resultados para compostos puros, e que a avaliação de matrizes complexas é muitas vezes dificultada, tornando os resultados pouco confiáveis. Por este motivo propuseram um método onde o DPPH foi utilizado como agente antioxidante indireto, havendo associação deste ensaio com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Apesar disso, pelo fato de o teste ser freqüentemente descrito na literatura para a avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, foi empregado nesse trabalho e comparado aos demais métodos utilizados (Yang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2006a; Ghafar *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2008).

Com relação à biotransformação dos sucos, foi possível observar que não há vantagem na utilização da associação das enzimas hesperidinase/naringinase/glicosidase nas condições de reação utilizadas. Isso pode ser explicado, pelo fato de que algumas destas enzimas apresentam as mesmas funções catalíticas. A naringinase e a hesperidinase, por exemplo, são ramnosidases (promovem hidrólise da molécula de ramnose) e possuem também ação  $\beta$ -D-glicosidase (promovendo hidrólise da molécula de glicose). Dessa forma, sugerimos que a ligação da naringinase ou da hesperidinase ao substrato leve a uma possível exclusão da ação da glicosidade, uma vez que atuam no mesmo sítio catalítico.

O aumento do potencial antioxidante dos sucos, verificado após as reações de biotransformação, pode ser justificado pela clivagem da fração glicosídica, que na estrutura das moléculas da hesperidina e da naringina se encontra na posição C7 do anel A.

Em relação à biotransformação dos chás, as enzimas utilizadas, hesperidinase e a  $\beta$ -galactosidase, apresentam sítios catalíticos diferentes. A  $\beta$ -galactosidase é a responsável pela clivagem da molécula da galactose do kaempferol glicosilado, enquanto a hesperidinase é a responsável pela clivagem da ramnose, produzindo o kaempferol aglicona.

Conforme observado nas Figuras 17 e 18, a forma aglicona produzida pela associação dessas duas enzimas, se comparada à amostra controle (antes da biotransformação), demonstra um aumento significativo na atividade antioxidante. Por outro lado, os resultados apontam que, ao comparar o desempenho da associação enzimática com o das enzimas

isoladas, não há diferença significativa de atividade. Isso denota que o kaempferol, para uma melhor atividade antioxidante, deve ser biotransformado, porém, não necessita de uma associação enzimática, ou seja, o uso de apenas uma das enzimas na sua biotransformação já produz resultados positivos e comparáveis aos produzidos pela associação enzimática.

Este evento demonstra que, apesar do bom desempenho da associação enzimática, a mesma não é racional, já que se obtêm resultados antioxidantes parecidos para as enzimas isoladas. Este resultado é animador com relação aos aspectos econômicos envolvidos no uso das enzimas para a obtenção de bebidas biotransformadas com maior potencial antioxidante, pois, necessitar-se-ia de um menor aporte financeiro da indústria alimentícia para a obtenção destes produtos.

Conforme mencionado por Park *et al.* (2006a), a atuação das enzimas hesperidinase e  $\beta$ -galactosidase nas moléculas dos flavonóides (rutina, quercetina-3-glicosídeo e kaempferol glicosilado) no chá verde provavelmente permite a liberação da fração 3-OH do anel C, deixando-a livre, o que favorece o aumento da atividade antioxidante.

Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante, os diferentes ensaios utilizados tiveram como finalidade fornecer dados que permitissem a comparação do desempenho de uma mesma amostra perante princípios diferentes de análise, visto que, conforme descrito na literatura, cada ensaio possui a sua limitação.

Como já explicitado por Castro-Gamboa & Pauletti (2004) o DPPH não é o método mais indicado para matrizes complexas. Por outro lado, no método  $\beta$ -caroteno – ácido linoléico outras substâncias oxidantes e/ou redutoras presentes na matriz alimentar, além da substância objeto do estudo, podem oferecer interferências nos resultados (Silva *et al.*, 1999). E embora artigos científicos descrevam o ORAC como um dos melhores métodos para a avaliação da atividade antioxidante (Ginny Bank & Alex Schauss, 2004), há controvérsias. Thaipong *et al.* (2006), por exemplo, descreveu que em seus experimentos o método FRAP foi mais reprodutível se comparado ao DPPH e ao ORAC.

Segundo Tomei & Salvador (2007), cada tipo de metodologia apresenta suas vantagens e desvantagens. Os métodos diretos mostram-se mais adequados para avaliação da atividade antioxidante, pois em geral são mais sensíveis. A desvantagem apresentada por estes métodos é que muitos deles são tempo-dependentes, o que sugere que suas aplicações requerem experiência em reações de cinética química. Por outro lado, métodos indiretos bem-desenvolvidos como, por exemplo, o DPPH e o Folin-Ciocalteu, são adequados, de fácil

manipulação e apesar de não apresentarem a mesma especificidade, também permitem uma adequada avaliação da atividade antioxidante. No entanto, um impasse na aplicação dos métodos indiretos é a sua baixa reprodutibilidade, sendo a razão principal disto o fato dos resultados serem altamente dependentes da concentração de reagentes e do tempo de incubação.

Huang *et al.* (2005) e Ou *et al.* (2001) compararam alguns métodos diretos e indiretos sob o ponto de vista do mecanismo de reações envolvidas no protocolo experimental e sugeriram que o ORAC e o Folin-Ciocalteu são ensaios adequados para se avaliar a atividade antioxidante de alimentos, produtos naturais e fluídos biológicos, apresentando vantagens uma vez que minimizam a possibilidade de ocorrência de reações falso-positivas.

No entanto, pode-se dizer que é sempre prudente que os dados obtidos com o método indireto sejam correlacionados com os dados obtidos por métodos diretos a fim de se obter uma maior segurança analítica dos resultados.

#### **4.6 - Caracterização química das amostras antes e após a biotransformação**

Com o objetivo de identificar um perfil químico, através do *fingerprinting* obtido por ESI-MS, as amostras de chá mate, verde e sucos de laranja e limão foram previamente preparadas e analisadas segundo método descrito no item 3.12.

A composição das amostras pode ser visualizada pelos perfis apresentados nas Figuras 21, 22, 23 e 24, correspondentes às amostras estudadas antes e após a biotransformação.

Na Figura 21 foram identificadas uma série de compostos conhecidos na literatura e possivelmente envolvidos com a atividade antioxidante do chá mate. No espectro da Figura 21A podem ser observadas espécies ionizadas de compostos como a quercetina ( $m/z$  301), cafeoilglicose ( $m/z$  341), ácido feruloilquínico ( $m/z$  367) e rutina ( $m/z$  609).

Após a reação de biotransformação (Figura 21B), pode ser observado um aumento na intensidade do sinal do fragmento quercetina aglicona ( $m/z$  301), proveniente da molécula da quercetina glicosilada (rutina  $m/z$  609), que após biotransformação tem a intensidade do seu sinal reduzido, o que comprova a ação das enzimas glicosídicas com a perda das unidades de açúcar (glicose  $m/z$  162 e ramnose  $m/z$  146).

Nos espectros do chá verde (Figura 22), pode ser identificada uma série de compostos conhecidos na literatura como constituintes dessa matriz alimentar e com importante potencial

antioxidante, tais como ácidos fenólicos, derivados dicafeoilquínicos ( $m/z$  515) e flavonóides glicosilados ( $m/z$  609,  $m/z$  593,  $m/z$  447).

No perfil após a biotransformação (Figura 22B) pode ser observado um aumento na intensidade do sinal do flavonóide quercetina aglicona ( $m/z$  301) e do flavonóide quercetina dihidratada ( $m/z$  337) provenientes da molécula da rutina (quercetina – 3 – rutinosídeo –  $m/z$  609), o que comprova a ação das enzimas glicosidases, com a retirada das unidades de açúcar (glicose  $m/z$  162 e ramnose  $m/z$  146).

Alguns flavonóides do tipo kaempferol glicosilados também podem ser observados nos dois espectros ( $m/z$  447 e  $m/z$  593); entretanto, no espectro após a biotransformação pode-se notar um pequeno aumento na intensidade desses sinais, provavelmente provenientes da quebra de moléculas de kaempferol glicosiladas e ainda mais complexas que estariam além da faixa de análise adotada neste estudo que foi de  $m/z$  100 a 1000. A faixa citada foi adotada com base nos artigos científicos que também utilizaram a metodologia da espectrometria de massas para a análise de polifenóis.

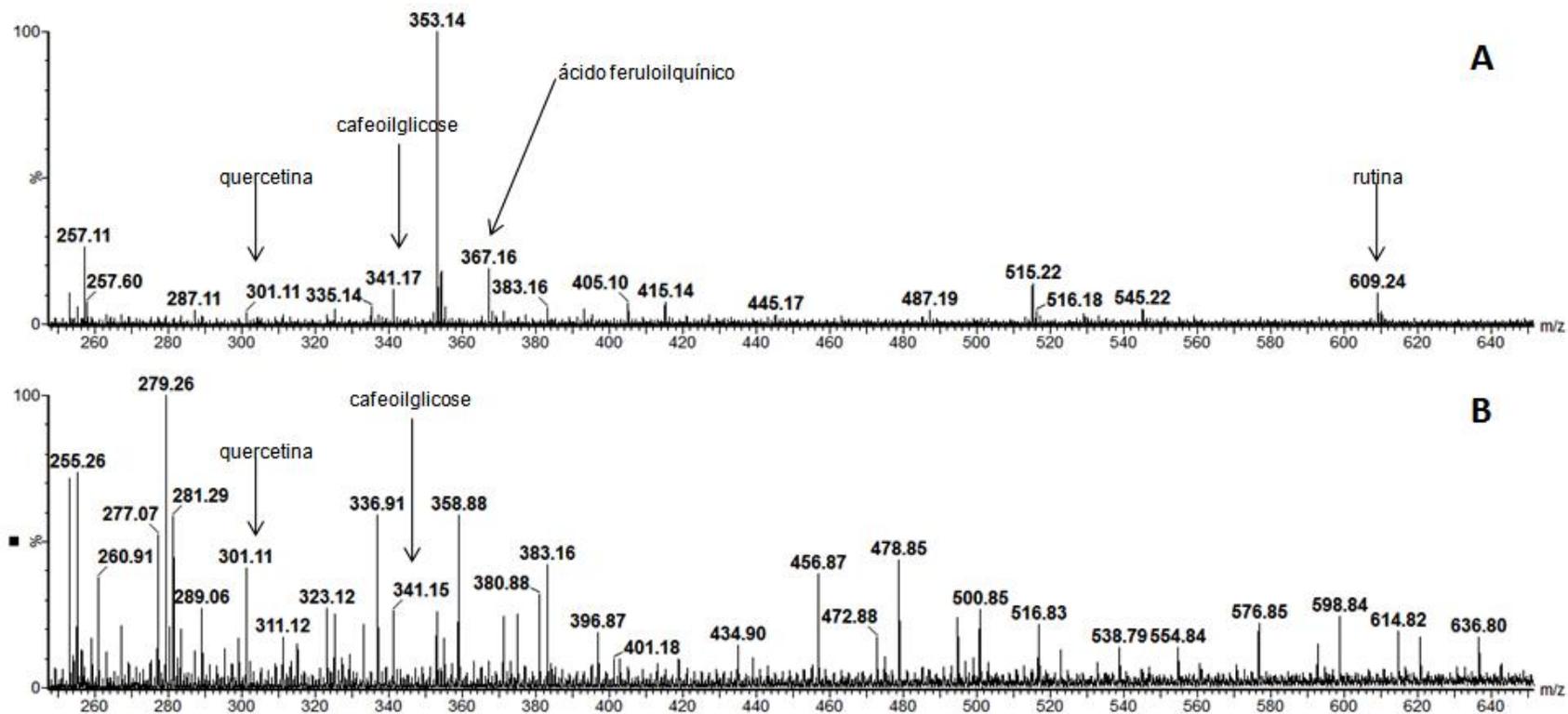


Figura 21 – Composição do chá mate antes da biotransformação (A) e do chá mate biotransformado por hesperidina e  $\beta$ -galactosidase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).

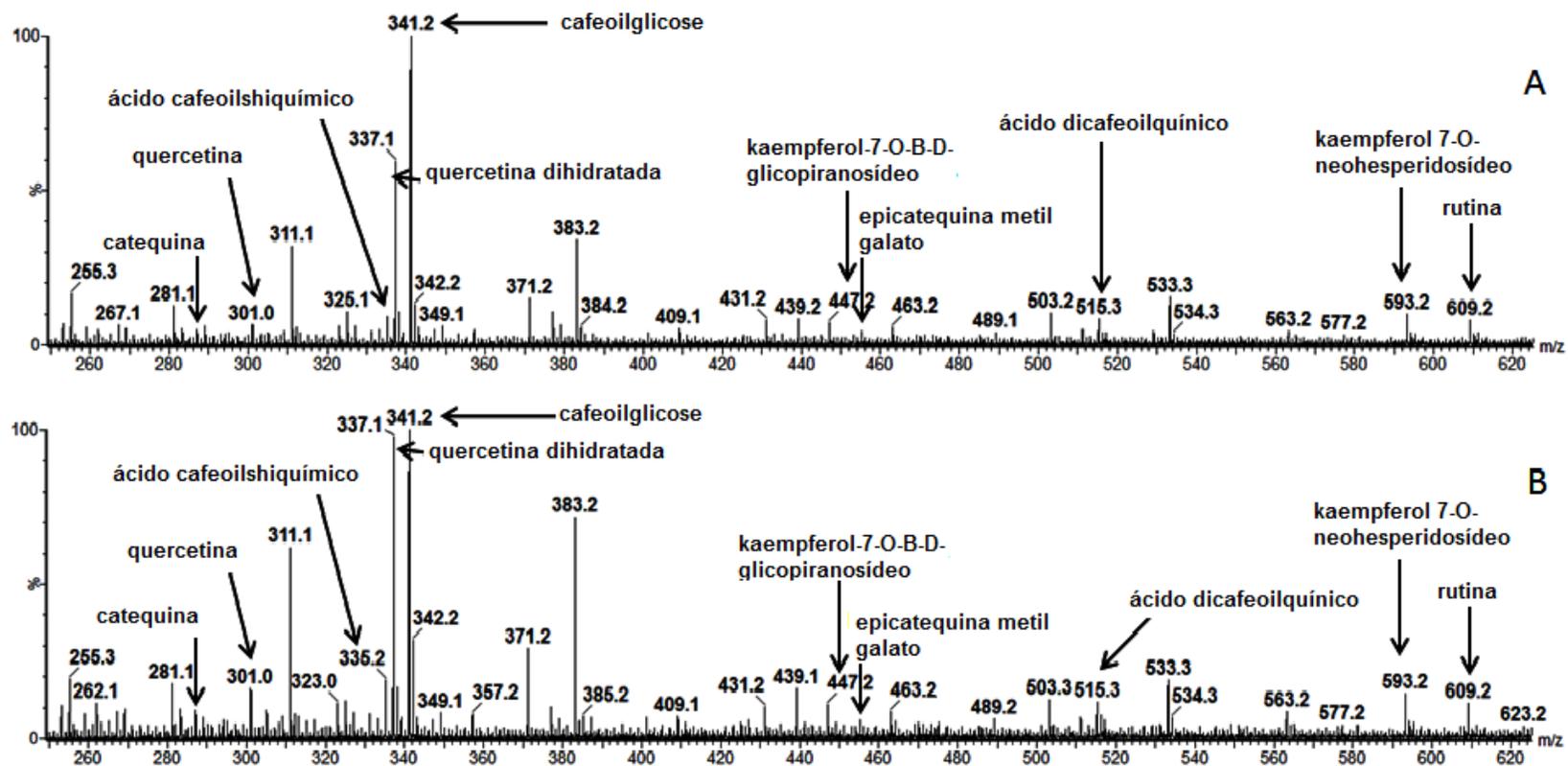


Figura 22 – Composição do chá verde antes da biotransformação (A) e do chá verde biotransformado por  $\beta$ -galactosidase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).

Na Figura 23 foram identificadas uma série de compostos conhecidos na literatura e possivelmente envolvidos com a atividade antioxidante do suco de laranja. No espectro da Figura 23A podem ser observadas espécies ionizadas de compostos como hesperidina ( $m/z$  609), hesperetina ( $m/z$  301) e tangeritina ( $m/z$  371).

No perfil do suco de laranja biotransformado (Figura 23B) pode ser observado um aumento do sinal do flavonóide aglicona hesperetina ( $m/z$  301) proveniente da clivagem da hesperidina ( $m/z$  609) após atuação das enzimas glicosidases, o que mostra a quebra das unidades de glicose  $m/z$  162 e ramnose  $m/z$  146. O flavonóide tangeritina aglicona nesses espectros não apresentou alteração no sinal, porém, após a biotransformação foi possível identificar o flavonóide naringenina (aglicona), não identificado no espectro antes da biotransformação.

Na Figura 24 foram identificados compostos conhecidos na literatura e possivelmente envolvidos com a atividade antioxidante do suco de limão. No espectro da Figura 24A podem ser observadas espécies ionizadas de compostos como hesperidina ( $m/z$  609), acacetina ( $m/z$  283) e tangeritina ( $m/z$  371).

No perfil do suco de limão biotransformado (Figura 24B) pode ser observado um aumento do sinal do flavonóide aglicona hesperetina ( $m/z$  301) proveniente da clivagem da hesperidina ( $m/z$  609) após atuação das enzimas glicosidases, o que mostra a quebra das unidades de glicose  $m/z$  162 e ramnose  $m/z$  146. O flavonóide tangeritina apresentou aumento no sinal após a biotransformação, provavelmente proveniente do seu flavonóide glicosilado que sofreu hidrólise enzimática.

Compostos não identificados nos espectros apresentados podem também fazer parte da composição das matrizes alimentares estudadas. O tratamento das amostras de chás e sucos com metanol, água e hidróxido de amônio permitiu a ionização e a identificação dos sinais dos flavonóides glicosilados e das agliconas de interesse. A utilização de outros solventes poderia permitir a ionização e a identificação de outros compostos provenientes da mesma matriz, no entanto, esses não faziam parte do objetivo desse estudo.

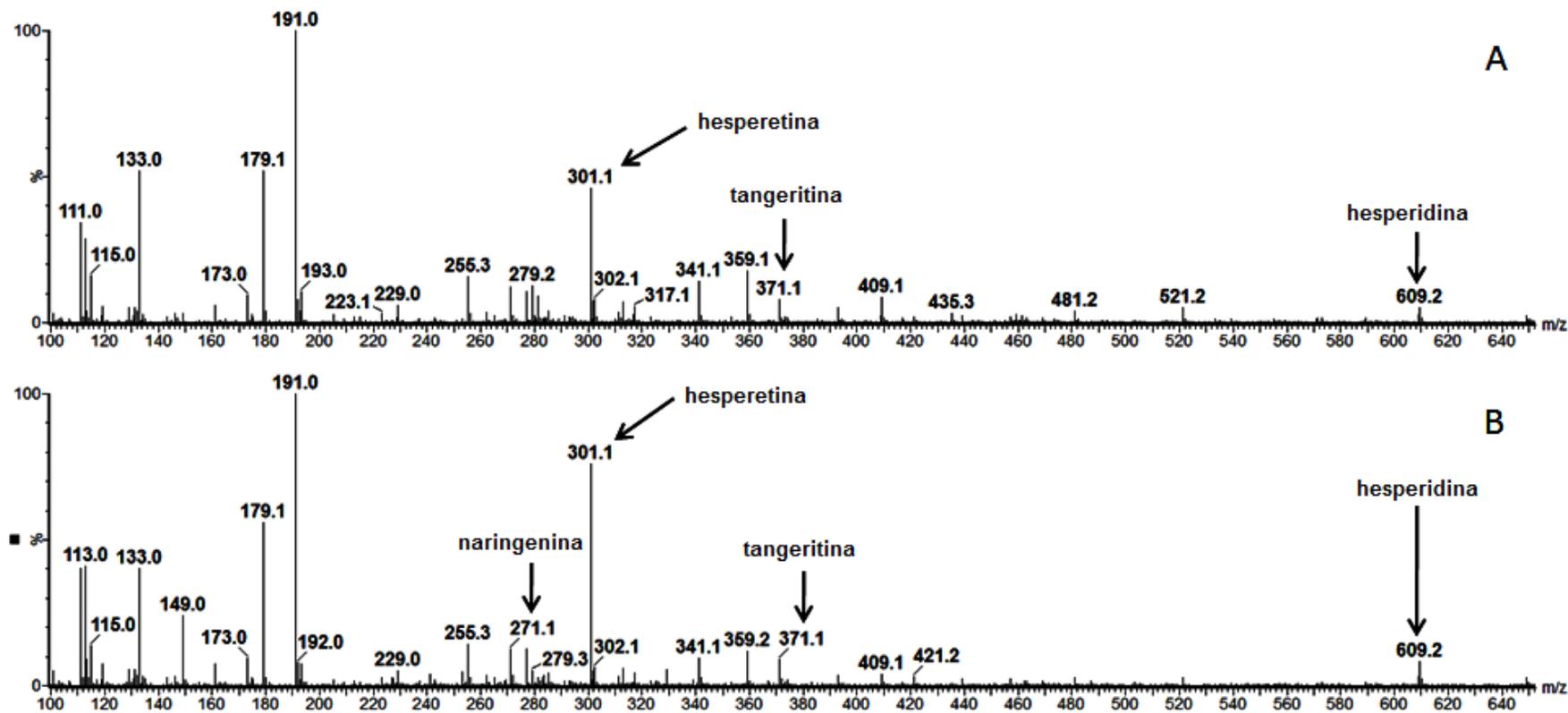


Figura 23 – Composição do suco de laranja antes da biotransformação (A) e do suco de laranja biotransformado por hesperidinase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).

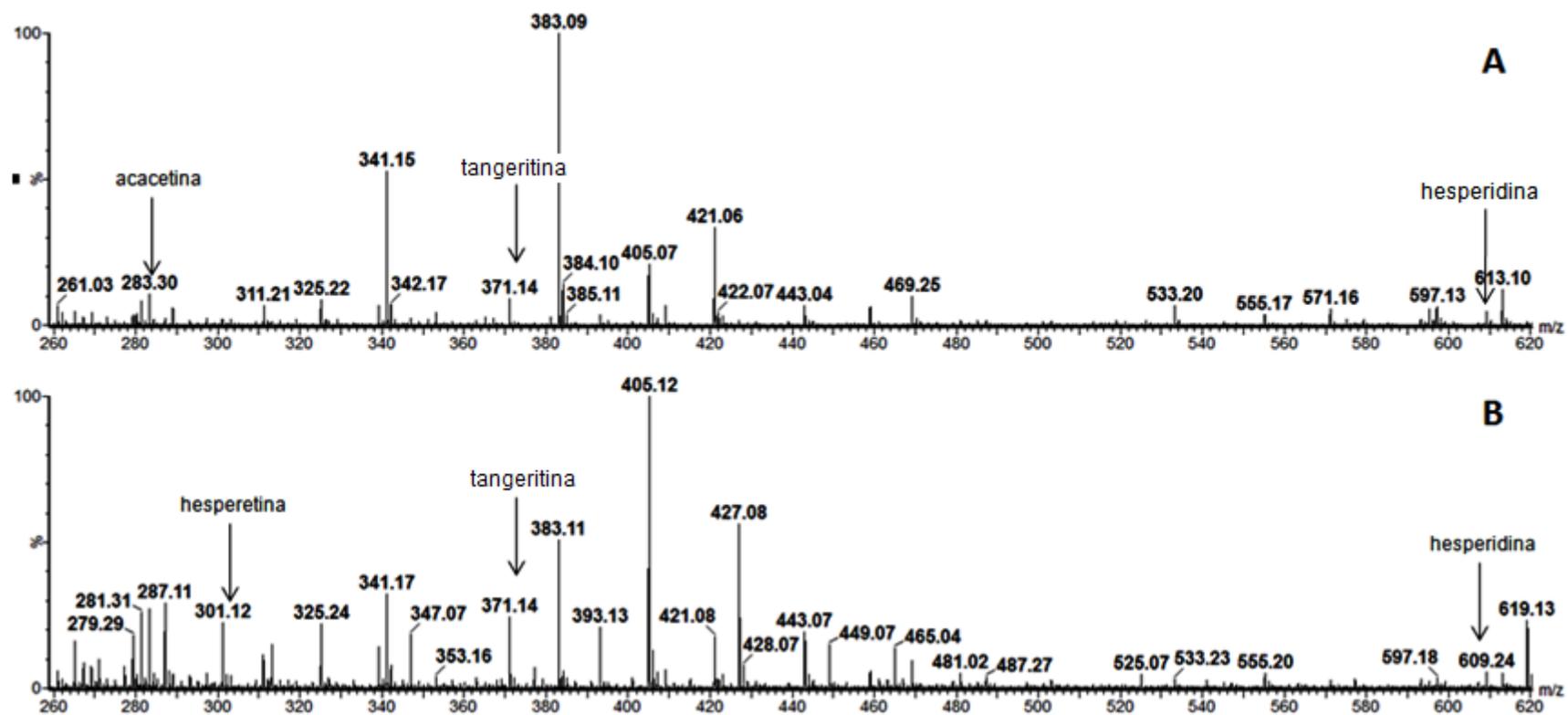


Figura 24 – Composição do suco de limão antes da biotransformação (A) e do suco de limão biotransformado por hesperidinase (B) analisados por espectrometria de massas (ESI(-)-MS).

Os espectros discutidos até o momento apresentaram os perfis MS das matrizes alimentares, antes e após a biotransformação. O que permitiu uma varredura identificando todos os componentes (capazes de se ionizar) de cada matriz estudada.

Por outro lado, o MS/MS permite o isolamento de uma espécie ionizada, ou seja, de um dos íons de interesse identificado no MS como, por exemplo, o íon de  $m/z$  609, permitindo identificar todos os íons provenientes da sua fragmentação. As figuras 25 e 26, a seguir, mostram os perfis MS/MS dos padrões ionizados de rutina ( $m/z$  609) e hesperidina ( $m/z$  609), uns dos principais componentes dos chás e dos sucos, respectivamente.

Na figura 25 pode ser observado o perfil MS/MS da molécula ionizada da rutina padrão ( $m/z$  609), gerando dentre outras espécies ionizadas a de  $m/z$  301, correspondente a quercetina.

Na figura 26 pode ser observado o perfil MS/MS da molécula ionizada da hesperidina padrão ( $m/z$  609), gerando principalmente a espécie de  $m/z$  301, correspondente a hesperetina.

Conforme discutido, as moléculas rutina e hesperidina, assim como outros flavonóides glicosilados mais complexos, são provenientes de suas formas mais simples, agliconas.

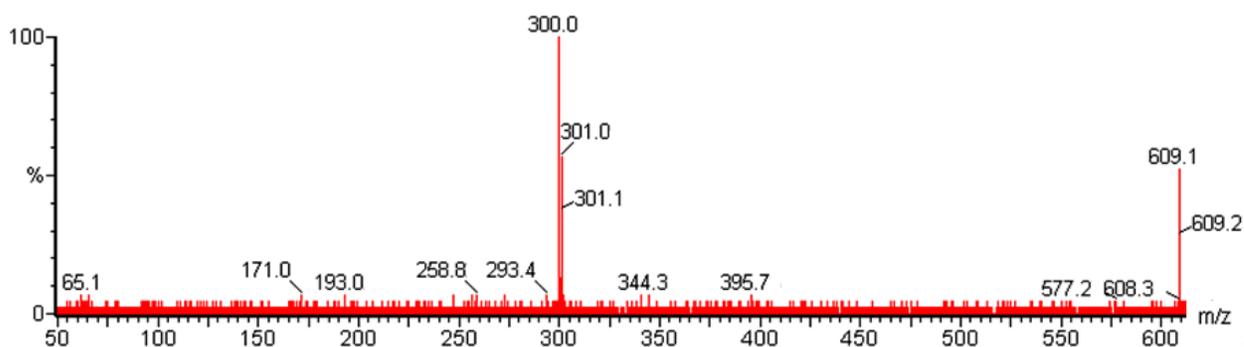


Figura 25 – Perfil (ESI(-)-MS/MS) do íon de  $m/z$  609 (rutina padrão) gerando  $m/z$  301 (quercetina).

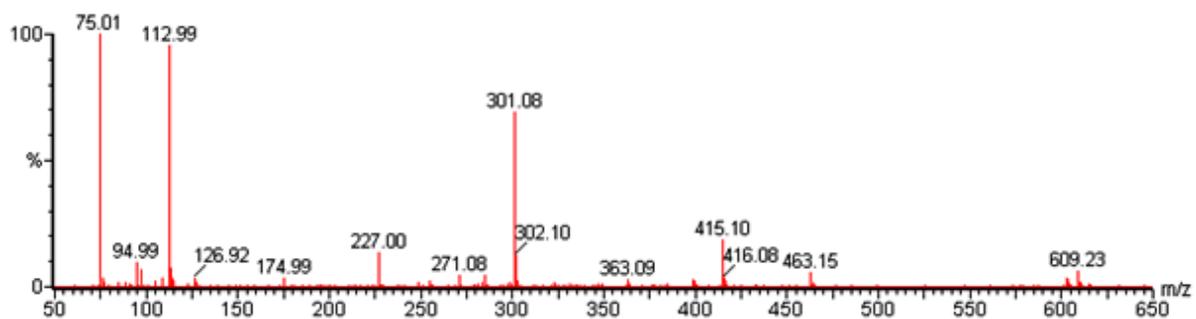


Figura 26 – Perfil (ESI(-)-MS/MS) do íon de  $m/z$  609 (hesperidina padrão) gerando  $m/z$  463 (após retirada da ramnose  $m/z$  146) e  $m/z$  301 (hesperetina, após a retirada da glicose  $m/z$  162).

Os resultados confirmam o que foi reportado por Park, Rho, Kim & Chang (2006a), onde os autores observaram que as formas agliconas ou os flavonóides menos complexos possuem maior atividade antioxidante que seus pares glicosilados de maior peso molecular. Estes autores descreveram a associação de diferentes enzimas para modificar os polifenóis presentes no chá verde. Os autores relataram que a associação entre a  $\beta$ -galactosidase e a hesperidinase foi usada de maneira efetiva na hidrólise dos kaempferol glicosilados (kaempferol-3-O-[2-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-glicopiranosose e kaempferol-3-O-[2-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-glicopiranosose) presentes em chá verde, o que gerou 95% de kaempferol aglicona. Os produtos resultantes apresentaram ganho significativo na atividade antioxidante, quando avaliados pelo ensaio DPPH. Porém, nesse estudo não foi realizado teste com as enzimas isoladas.

É importante ressaltar que, até o momento, testes que avaliem a atividade antioxidante de polifenóis biotransformados por reações de desglicosilação são muito raros, o que limita a comparação desse estudo com trabalhos anteriores. Alguns artigos tratam da atividade antioxidante dos chás e dos sucos por meio dos testes *in vitro* descritos neste trabalho, mas sem a biotransformação da matriz alimentar.

Embora estudos a respeito da atividade antioxidante em amostras biotransformadas sejam escassos, experimentos a fim de avaliar a biodisponibilidade e a atividade antioxidante como o de Day, Gee, DuPont, Johnson & Williamson (2003) ou em humanos como o estudo de Hollman & Katan (1997), já levantavam a hipótese de que a retirada da fração glicosídica poderia oferecer benefícios em relação a atividade antioxidante.

É válido ressaltar ainda que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme RDC 26 de 2009, aprova o uso de enzimas como a glicosidase de *Aspergillus niger* e a  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, utilizadas nesse estudo, em alimentos comercializados para o uso humano. Isto proporciona uma importante área de pesquisa para que a indústria alimentícia desenvolva produtos de maior potencial antioxidante, favorecendo desta forma o consumidor e explorando ainda mais os benefícios dos flavonóides na dieta.

## 5 - CONCLUSÃO

A utilização dos flavonóides padrões (rutina e kaempferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo) como substratos, permitiu a determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade das enzimas utilizadas no estudo e a definição das condições ótimas de biotransformação.

As enzimas hesperidinase, naringinase, glicosidase e  $\beta$ -galactosidase comerciais foram capazes de biotransformar de forma favorável os substratos estudados, produzindo flavonóides agliconas ou menos complexos, o que levou a um incremento significativo na capacidade antioxidante destas bebidas, podendo até mesmo duplicar essa atividade conforme determinado nos sucos pelo método ORAC.

Os espectros de massas confirmaram a atuação das enzimas na hidrólise das frações glicosídicas dos flavonóides glicosilados, gerando produtos na forma aglicona ou menos complexos.

O uso das enzimas de forma associada (hesperidinase/naringinase com a glicosidase), para a biotransformação dos sucos, assim como a hesperidinase/ $\beta$ -galactosidase no caso dos chás, embora tenha mostrado efeito favorável, este não foi superior ao das amostras onde foram utilizadas as enzimas isoladas, o que não justifica o seu emprego.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahene, A.S.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, 18, 75-81, 2002.

Ameer, B.; Weintraub, R.A.; Johnson, J.V.; Yost, R.A.; Rouseff, R.L. Flavone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 60(1):34-40, 1996.

Archivio, M.D.; Filesi, C.; Benedetto, R.D.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell' Instituto Superiore di Sanità**, 43(4):348-361, 2007.

Balentine, D.A.; Wiseman, S.A.; Bouwens, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. **Critic Reviews in Food Science and Nutrition**, 37(8):693-704, 1997.

Barreiros, A.L.B.S.; David, J.P.; David, J.M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécie reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, 29, 113-123, 2006.

Bastos, D.H.M.; Fornari, A.C.; Queiroz, Y.S.; Torres, E.A.F.S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49(3):399-404, 2006.

Bastos, D.H.M.; Saldanha, L.A.; Catharino, R.R.; Sawaya, A.C.H.F.; Cunha, I.B.S.; Carvalho, P.O.; Eberlin, M.N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules (Basel)**, 12, 423-432, 2007.

Bastos, D.H.M.; Torres, E.A.F.S. Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages and public health. **Nutrire Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, 26, 77-89, 2003.

Battestin, V.; Macedo, G.A.; Freitas, V.A.P.D. Hidrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, 108, 228-233, 2008.

Behling, E.B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, 15(3):285-292, 2004.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, 299, 15-27, 1999.

Birt, D.F.; Hendrich, S.; Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 90, 157-177, 2001.

Bracesco, N.; Sanchez, A.G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, 2010. No prelo.

Cabrera, C.; Artacho, R.; Giménez, R. Beneficial effects of green tea - A review. **American College of Nutrition**, 25(2):79-99, 2006.

Cao, G.H.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and Prooxidant behavior os flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, 22, 749-760, 1997.

Cao, X.; Ito, Y. Preparation and purification of epigallocatechin by high-speed counter current chromatography (HSCCC). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 27, 145–152, 2004.

Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A. Validation of a liquid chromatography ion spray mass spectrometry method for the analysis of flavanones, flavones and flavonols. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 13(23):2399–2405, 1999.

Carrão-Panizzi, M.C.; Bordignon, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glycosides in soybean cultivars affected by the enviroment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(5):873-878, 2000.

Castro-Gamboa, I.; Pauletti, P.M. Uso de metodologias cromatográficas hifenadas no entendimento de associações sinérgicas micromoleculares em matrizes naturais complexas e na detecção de substâncias com potencial antioxidante e antimalárico. **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**, Universidade Federal Fluminense, 2004.

Cazarolli, L.H.; Zanatta, L.; Alberton, E.H.; Figueiredo, M.S.R.B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Journal of Medical Chemistry**. 8(13):1429-1440, 2008.

Chandra, S.; Mejia, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 3583-3589, 2004.

Colombo, V. **Polissacarídeos extracelulares e atividade enzimática das glicosidases no reservatório de Barra Bonita, SP, Brasil**. 119 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Botânica, 2006.

Coutinho, M.A.S.; Muzitano, M.F.; Costa, S.S. Flavonóides, potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, 1(3):241-256, 2009.

Cruz, R.; Cruz, V.D.A.; Belote, J.G.; Khenayfes, M.O.; Dorta, C.; Oliveira, L.H.S. Properties of a new fungal  $\beta$ -galactosidase with potential application in the dairy industry. **Revista de Microbiologia**, 30, 265-271, 1999.

Cunha, C.R.M.; Alencar, R.G.; De Oliveira, V. Bioconversão: uma alternativa sintética para a produção de derivados funcionalizados da naringina e naringenina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 4(2):19-22, 2007.

Day, A.J.; Gee, J.M.; DuPont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. Absorption of quercetina-3-glucoside and quercitina-4-glucoside in the rat small intestine: role of lactase phlorizin hydrolase and sodium-dependent glucose transporter. **Biochemical Pharmacology**, 65(7):1199-1206, 2003.

de Aguiar, C.M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 106 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Toledo, 2010.

de Moraes, E.C.; Stefanuto, A.; Klein, G.A.; Boaventura, B.C.; de Andrade, F.; Wazlawik, E.; Di Pietro, P.F.; Maraschin, M.; da Silva, E.L. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(18):8316-8324, 2009.

Dhake, A.B.; Patil, M.B. Produção de  $\beta$ -glucosidase por *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36(2):170-176, 2005.

Dhake, A.; Patil, M. Characterization of cell wall bound  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium purpurogenum*. **Romanian Biotechnological Letters**, 12(5):3441-3448, 2007.

Duarte-Almeida, J.M.; Santos, R.J.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(2):446-452, 2006.

Dugo, G.; Giacomo, A. **Citrus: The genus citrus**. New York: Taylor e Francis, 2002.

Erlund, I.; Meririnne, E.; Alfthan, G.; Aro, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenina and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. **Journal of Nutrition**, 131, 235-241, 2001.

Erlund, I.; Silast, M.L.; Alfthan, G.; Rantala, M.; Kesaniemi, Y.A.; Aro, A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenina and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. **European Journal of Clinical Nutrition**, 56(9):891-898, 2002.

Escarpa, A.; Gonzales, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 31, 57-119, 2001.

Faller, A.L.K.; Fialho, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 43(2):211-218, 2009.

Faria, A.; Oliveira, J.; Neves, P.; Gameiro, P.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V.; Mateus, N. Antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 6896-6902, 2005.

Filip, R.; López, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, 72, 774-778, 2001.

Galarraga, J. V. **Efeito da hesperidina no perfil lipídico de ratos tratados com dieta acrescida de ácidos graxos saturados**. 72 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, 2008.

Gallego, M.V.; Pinaga, F.; Ramon, D.; Valles, S. Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in Winemaking. **Journal of Food Science**, 66, 204-209, 2001.

Gattuso, G.; Barreca, D.; Gargiulli, C.; Leuzi, U.; Caristi, C. Flavonoid Composition of *Citrus* Juices. **Molecules**, 12, 1641-1673, 2007.

Ghafar, M.F.A.; Prasad, K.N.; Weng, K.K.; Ismail, A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from *Citrus* species. **African Journal of Biotechnology**, 9(3):326-330, 2010.

Ginny Bank, M.A.; Alex Schauss. Testes de antioxidantes: As últimas novidades sobre o ORAC. [Acesso em: 10 set. 2010]. Disponível em: <<http://www.nutraceuticalsworld.com>>.

González-Gallego, J.; García-Mediavilla, V.; Sánchez-Campos, S.; Tuñón, M.J. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. **The British Journal of Nutrition**, 104(3):15-27, 2010.

Hashimoto, W.; Nankai, H.; Sato, N.; Kawai, S.; Murata, K. Characterization of alpha-L-rhamnosidase of *Bacillus* sp GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 368(1):56-60, 1999.

Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 13, 572-584, 2002.

Henning, S.M.; Choo, J.J.; Heber, D. Nongallated compared with gallated flavan-3-ols in green and black tea are more bioavailable. **The Journal of Nutrition**, 138(8):1529-1534, 2008.

Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Komhout, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutrition and Cancer**, 20, 21-29, 1993.

Hollman, P.C.; Bijsman, M.N.; Van Gameren, Y.; Cnossen, E.P.; de Vries, J.H.; Katan, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, 31, 569-573, 1999.

Hollman, P.C.; Katan, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 51, 305-310, 1997.

Holst, B.; Williamson, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, 19(2):73-82, 2008.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 1841-1856, 2005.

Inaba, H.; Tagashira, M.; Honma, D.; Kanda, T.; Kou, Y.; Ohtake, Y.; Amano, A. Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 31, 527, 2008.

Katiyar, S.K. Skin photoprotection by green tea: Antioxidant and immunomodulatory effects. **Current Drug Targets**, 3, 234-242, 2003.

Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from *Citrus* juices. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 47, 128-135, 1999.

Khokhar, S.; Magnusdottir, S.G.M. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 50, 565-570, 2002.

Kim, H.P.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacology Science**, 96(3): 229-245, 2004.

Ko, S-R.; Choi, K-J.; Suzuki, K.; Suzuki, Y. Enzymatic preparation of ginsenosides RG<sub>2</sub>, RH<sub>1</sub> and F<sub>1</sub>. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 51, 404-408, 2003.

Lambert, J.D.; Yang, C.S. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. **The American Society for Nutritional Sciences**, 133, 3262-3267, 2003.

Lee, M.J.; Lambert, J.D.; Prabhu, S.; Meng, X.F.; Lu, H.; Maliakal, P.; Ho, C.T.; Yang, C.S. Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea levels and black tea extract. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 13, 132-137, 2004.

Limasset, B.; Doucen, C.I.; Dore, J.C.; Ojaso, T.; Damon, M.; de Pault, A.C. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, 46(7):1257–1271, 1993.

Maccari Junior, A.; Mazuchowski, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva Mate/Ministério da Ciência e Tecnologia-PADCT, 2000. p.176.

Macedo, J.A.; Battestin, V.; Ribeiro, M.L.; Macedo, G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, 126(2):491-497, 2011.

Majchrzak, D.; Mitter, S.; Elmadfa, I. The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. **Food Chemistry**, 88(3):447–451, 2004.

Manach, C.; Morand, C.; Gil-Izquierdo, A.; Bouteloup-Demange, C.; Rémésy, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**, 57, 235-242, 2003.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79(5):727-747, 2004.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81(1):230–242, 2005.

Manzanares, P.; Orejas, M.; Ibanez, E.; Valles, S.; Ramon, D. Purification and characterization of an alpha-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. **Letters in Applied Microbiology**, 31(3):198-202, 2000.

Março, P.H.; Poppi, R.J.; Scarminio, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, 31(5):1218-1223, 2008.

Matsubara, S.; Rodriguez-Amaya, D.B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(2):380-385, 2006.

McKay D.L.; Blumberg, J.B. The role of tea in human health: An update. **Journal of American College of Nutrition**, 21, 1-13, 2002.

Meyer, U. Overview of enzymes of drug metabolism. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, 24, 449-459, 1996.

Miranda, D.D.C.; Arcari, D.P.; Pedrazzoli Jr., J.; Carvalho, P.O.; Cerutti, S.M.; Bastos, D.H.M.; Ribeiro, M.L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, 23, 261-265, 2008.

Miyake, T.; Yumoto, T. United States Patent number: 6, 048, 712, Date of Patent: Apr., 11, 2000.

Miyake, T.; Yumoto, T. United States Patent number: 5, 885, 969, Date of Patent: Mar., 23, 1999.

Monti, D.; Pisvejcová, A.; Kren, V.; Lama, M.; Riva, S. Generation of a  $\alpha$ -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. **Wiley InterScience**, 87(6):763-771, 2004.

Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Arzouyan, C. R.; Estienne, J. M. Différenciation des jus de *Citrus* par analyses statistiques multivariées. Partie II. Cas des oranges et des mandarines. **Analisis**, 24(6):230–239, 1996.

Nakkharat, P.; Tesnum, A.; Maethawarakorn, A.; Haltrich, D.; Muangnapoh, C. Characterization of a Crude Thermostable  $\beta$ -galactosidase by the Bacterium PD1 Isolated from the Pong Dueat Hot Spring, **Natural Science**, 42, 264-268, 2008.

Németh, K.; Plumb, G.W.; Berrin, J.G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H.Y.; Williamson, G.; Swallow, D.M.; Kroon, P.A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, 42(1):29-42, 2003.

Nielsen, I.L.F.; Chee, W.S.S.; Poulsen, L.; Offord-Cavin, E.; Rasmussen, S.E.; Frederksen, H.; Enslin, M.; Barron, D.; Horcajada, M.N.; Williamson, G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: A randomized, double-blind, crossover trial. **Journal of Nutrition**, 136(2):404-408, 2006.

Norouzian, D.; Hosseinzadeh, A.; Nouri Inanlou, D.; Moazami, M. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, 16, 471-473, 2000.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, 351-358, 1979.

Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 4619-4626, 2001.

Park, J.S.; Rho, H.S.; Kim, D.H.; Chang, I.S. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54, 2951-2956, 2006a.

Park, J.S.; Yeom, M.H.; Park, W.S.; Joo, K.M.; Rho, H.S.; Kim, D.H.; Chang, I.S. Enzymatic hydrolysis of green tea seed extract and its activity on 5 $\alpha$ -Reductase inhibition. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 70(2):387-394, 2006b.

Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 51, 3273-3279, 2003.

Pupin, A. M.; Dennis, M. J.; Toledo, M. C. F. Polymethoxylated flavones in Brazilian orange juice. **Food Chemistry**, 63(4):513–518, 1998.

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

Quinabra, Química Natural Brasileira. A importância da utilização dos bioflavonóides na nutrição animal. [Acesso em: 10 set. 2010]. Disponível em: <<http://www.quinabra.com.br>>.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**. 4<sup>o</sup> edição. Guanabara Koogan, 2001.

Resolução RDC-26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mai. 2009. [Acesso em: 10 set. 2010]. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

Roginski, V.; Lissi, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, 92, 235-254, 2005.

Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Moraes, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Calixto, F.D.S. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, 125, 1-4, 2006.

Saito, T.; Miyata, G. The nutraceutical benefit, Part 1: Green tea. **Nutrition**, 16(5):315-317, 2000.

Salem, J.H.; Humeau, C.; Chevalot, I.; Harscoat-Schiavo, C. Effect of donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. **Process Biochemistry**, 45(3):382-389, 2010.

Salvador, M.J.; Ferreira, E.O.; Mertens-Talcott, S.U.; Castro, W.V.; Butterweck, V.; Derendorf, H.; Dias, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift Fur Naturforschung C**, 61, 19-25, 2006.

Sanchez-Moreno, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, 8, 121-137, 2002.

Santangelo, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; di Benedetto, R.; Filesi, C.; Masella, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Instituto Superiore di Sanità**, 43(4):394-405, 2007.

Santiago, P.A.; Marquez, L.D.S.; Cardoso, V.L.; Ribeiro, E.J. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24(4):567-572, 2004.

Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 1094-1117, 2000.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **American Society for Nutritional Sciences**, 130, 2073-2085, 2000.

Signoretto, N.D.; Macedo, G.A. Isolamento e seleção de fungos para produção de naringinase em meio sólido. **XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp**, Campinas, 2010.

Silva, F.A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St.Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)**. 243 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, 2007.

Silva, F.A.M.; Borges, M.F.M.; Ferreira, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 22(1):94-103, 1999.

Silva, M.M.; Santos, M.R.; Carço, G.; Rocha, R.; Justino, G.; Mira, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, 36(11):1219-1227, 2002.

Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152-178, 1999.

Somogyi, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, 160, 61-68, 1945.

Soria, F.F.; Cuevas, C.; Ellenrieder, G. Purification and some properties of a  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus*. **Applied Biological Science**, 5, 109-120, 2004.

Suzuki, M.; Tabuchi, M.; Ikeda, M.; Umegaki, K.; Tomita, T. Protective effects of green tea catechins on cerebral ischemic damage. **Medical Science Monitor**, 10(6):166-174, 2004.

Takeo, T. Green tea and semi-fermented teas. In Willson, K.C. e Clifford, M.N. **Tea: Cultivation to Consumption**. London: Chapman & Hall, 1992. cap. 13: p.413 - 454.

Thaipong, K.U.; Boonprakob, K.; Crosby, L.; Cisneros-Zevallos and D.K. Byrne. Comparisons of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 669-675, 2006.

Tomei, R.R.; Salvador, M.J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, Campinas, 2007.

Tsai, T.H.; Tsai, T.H.; Chien, Y.C.; Lee, C.W.; Tsai, P.J. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. **Food Chemistry**, 110(4):859-864, 2008.

Vallejo, F.; Larrosa, M.; Escudero, E.; Zafrilla, M.P.; Cerdá, B.; Boza, J.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58, 6516-6524, 2010.

Walle, T.; Walgren, R.A.; Walle, U.K.; Galijatovic, A.; Vaidyanathan, J.B. Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 Cells. In: Rice-Evans C, Packer L, editores. **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.349–362.

Whitaker, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Science**. 2ª. edição. New York: Marcel Dekker, INC, 1994.

Wiseman, S.; Balantine, D.A.; Frei, B. Antioxidants in tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 37, 705-718, 1997.

Wu, C.D.; Wei, G.X. Tea as a functional food for oral health. **Nutrition**, 18, 443-444, 2002.

Yang, B.; Koiani, A.; Arai, K.; Kusu, F. Relationship of eletrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. Chemical **Pharmaceutical Bulletin**, 49, 747-751, 2001.

Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, 21, 381-406, 2001.

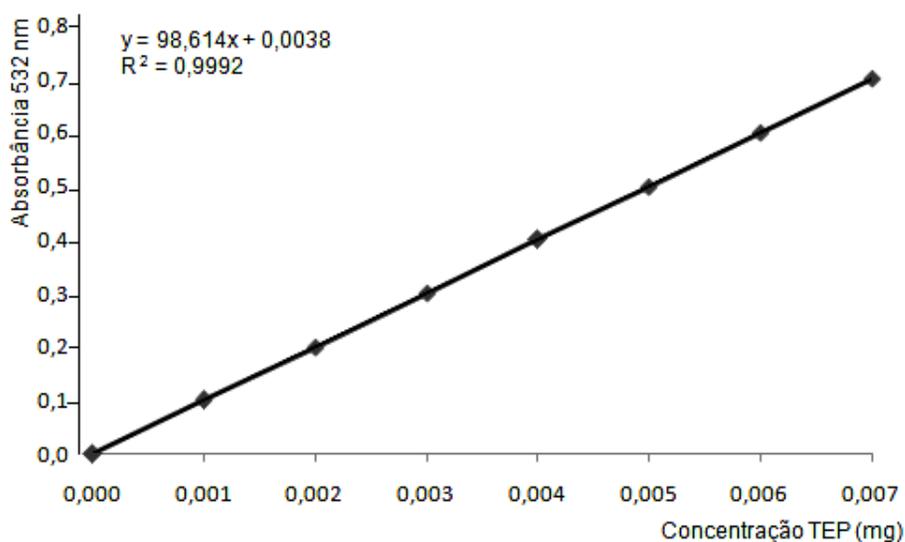
Yang, C.S.; Sang, S.; Lambert, J.D.; Lee, M.J. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. **Molecular Nutrition and Food Research**, 52, 139-151, 2008.

Yang, J.; Yang, L.; Wang, F.; Wu, C. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58(11):6525-6531, 2010.

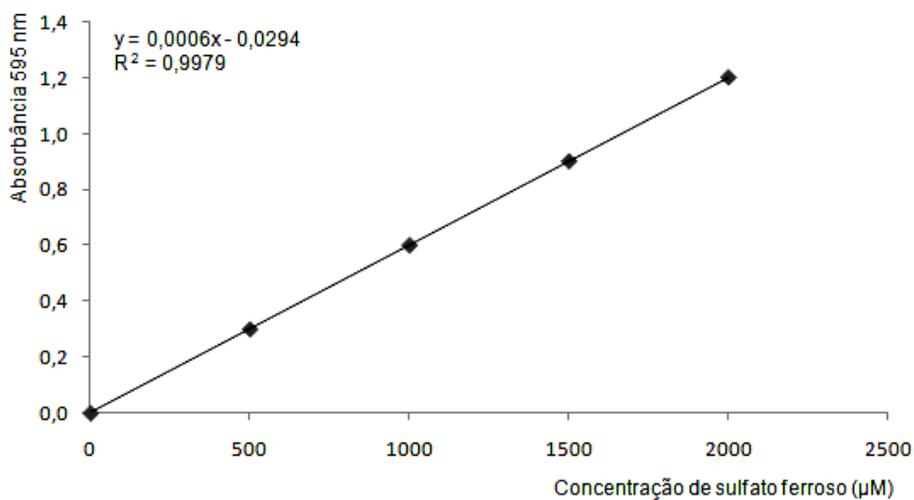
Yoon, J.H.; Baek, S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, 46(5):585-596, 2005.

Zielinska-Przyjemska, M.; Ignatowicz, E. Citrus fruit flavonoids influence on neutrophil apoptosis and oxidative metabolism. **Phytotherapy Research**, 22(12):1557-1562, 2008.

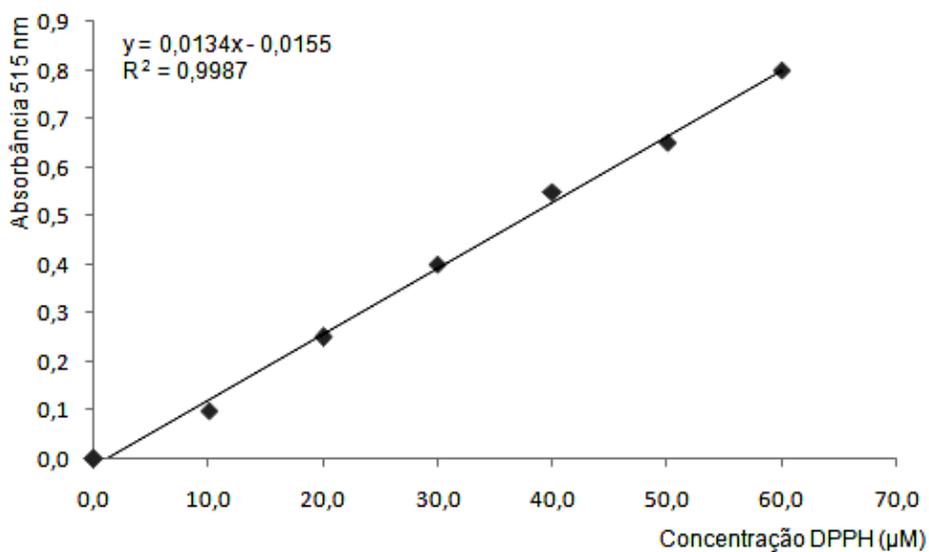
## 7 - ANEXOS



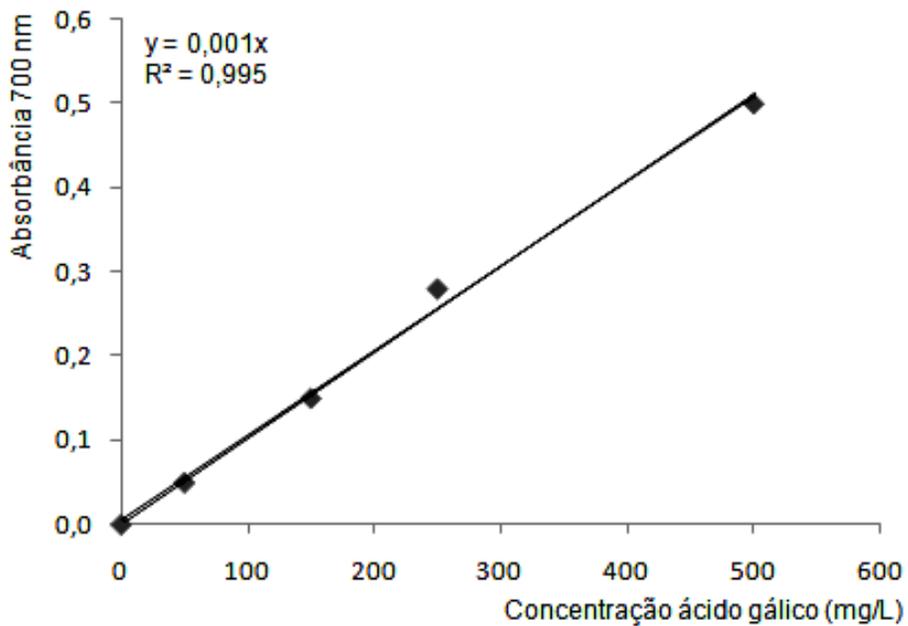
Anexo 1 – Curva padrão de tetraetoxipropano utilizada no ensaio de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.



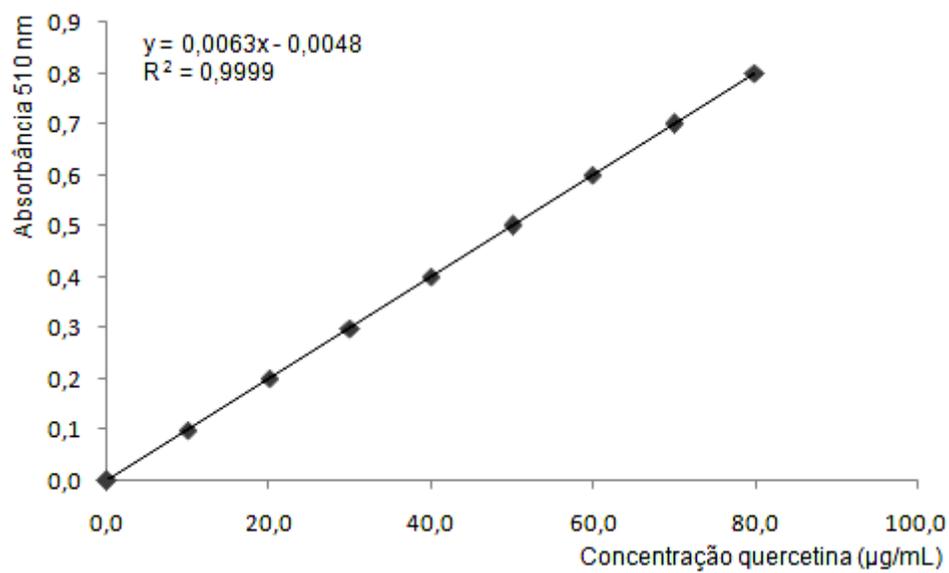
Anexo 2 – Curva padrão de sulfato ferroso utilizada no ensaio do poder antioxidante de redução do ferro.



Anexo 3 – Curva padrão de DPPH utilizada no ensaio de seqüestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.



Anexo 4 – Curva padrão de ácido gálico utilizada no ensaio de quantificação dos compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu.



Anexo 5 – Curva padrão de quercetina utilizada no ensaio de quantificação dos flavonóides totais.