

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

MARIA ELISA MELO BRANCO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIPROLIFERATIVA DA RUTINA E SEUS PRODUTOS
OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

Bragança Paulista

2012

MARIA ELISA MELO BRANCO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIPROLIFERATIVA DA RUTINA E SEUS PRODUTOS
OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Ciências da Saúde da Universidade
São Francisco como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia de
Oliveira Carvalho

Bragança Paulista

2012

QV 325 Araújo, Maria Elisa Melo Branco de.
A69a Avaliação das atividades antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática / Maria Elisa Melo Branco de Araújo. -- Bragança Paulista, 2012.
78 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

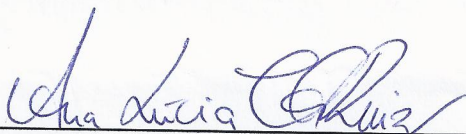
Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Quercetina-3-glicosídeo. 2. Rutina. 3. Atividade Antioxidante. 4. Atividade antiproliferativa. 5. Hidrólise. 6. Hesperidinase. I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

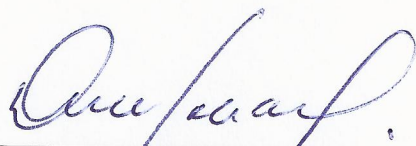
Araújo, Maria Elisa Melo Branco de "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DA RUTINA E SEUS PRODUTOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA" Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de Junho de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. Denise Gonçalves Priólli
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho a meu saudoso pai,
Antônio Heli Botto de Araújo, que desde
cedo contribuiu para o meu gosto pelo
conhecimento, ensinando-me a ler aos
cinco anos de idade.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Prof.^a Dr.^a Patrícia de Oliveira Carvalho, pela orientação, amizade e confiança.

Aos professores do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco de Bragança Paulista, em especial à Prof.^a Dr.^a Denise Gonçalves Prioli.

À Dr.^a Alexandra Frankland Sawaya, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia (IB - Unicamp), pelo auxílio nas análises cromatográficas.

À Prof.^a Ana Lucia T. Ruiz, ao Prof. João Ernesto de Carvalho, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - Unicamp), e à aluna Mariana Alves Sobreiro, pelo auxílio nas análises celulares.

Aos colegas de pesquisa Yollanda Moreira Franco, Natália Dalfré e Marco Aurélio Conrado, pela amizade e pelo auxílio nos experimentos.

Aos técnicos dos laboratórios de graduação da Universidade São Francisco de Bragança Paulista e aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia, Fabiano Sallowicz e Lúcio César Oliveira.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Vilma Aparecida Tescke de Freitas e Rita de Cássia Lima.

À minha mãe, Maria de Fátima Aparecida de Melo, pela confiança, pelo amor e pelo apoio que transcende a distância física.

Ao Thiago Grando Alberto, meu namorado e companheiro de laboratório, por acreditar em mim, me incentivar e auxiliar durante a execução deste projeto e em todos os aspectos da minha vida.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa, heterônimo Ricardo Reis

RESUMO

Relatos e evidências epidemiológicas sugerem que dietas ricas em quercetina e seus derivados glicosídicos têm efeitos na prevenção e no tratamento de importantes doenças, como cardiovasculares e câncer. A conversão da quercetina rutinosídeo (rutina), um flavonóide abundante na natureza, em quercetina 3-glicosídeo (Q3G) pela retirada da molécula de ramnose da rutina é uma estratégia importante para aumentar a sua biodisponibilidade. A Q3G possui distribuição escassa nos alimentos, portanto seu consumo a partir da dieta é baixo e os processos para seu isolamento a partir de matrizes naturais são pouco eficientes. Neste trabalho foi avaliada a eficácia da hidrólise química (ácida) e enzimática catalisada pela hesperidinase de *Penicillium* sp. para a síntese de Q3G. O complexo enzimático hesperidinase com ação de α -L-ramnosidase (retirada da molécula de ramnose) e β -D-glicosidase (retirada da molécula de glicose) foi submetido a diferentes tratamentos térmicos para inativar a atividade indesejável da β -D-glicosidase. A cinética de hidrólise da rutina e a quantificação dos produtos de reação foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE - EM). A quercetina e a rutina antes e após tratamento enzimático foram avaliadas *in vitro* em relação à atividade antioxidante pelos métodos de sequestro de radicais DPPH, descolorimento do β -caroteno e inibição da xantina oxidase (XO); e em relação à atividade antiproliferativa com o emprego de um painel de células tumorais humanas, utilizando o ensaio da sulforrodamina B para avaliação do crescimento celular. Foi possível definir a melhor condição para a inativação térmica da fração β -D-glicosidase da hesperidinase, o que levou à obtenção de altas taxas de Q3G (69,5%) após 4 horas de hidrólise da rutina catalisada pela hesperidinase previamente aquecida a 70°C por 30 minutos. A hidrólise enzimática se mostrou vantajosa em relação ao processo químico, uma vez que foi possível controlar o processo de hidrólise mantendo a molécula de glicose esterificada a quercetina. A rutina hidrolisada (mistura contendo 69,5% de Q3G e 7,5% de quercetina) mostrou maior atividade antioxidante avaliada pelo método de neutralização de radicais DPPH ($81,4 \pm 2,3\%$) quando comparada à rutina ($62,6 \pm 6,9\%$; $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas nas capacidades de inibição da peroxidação lipídica, avaliada pelo método de descolorimento do β -caroteno, e de inibição da xantina oxidase antes e após tratamento enzimático da rutina. A presença de substituintes glicosídicos no grupamento hidroxila (OH) da posição 3 no anel C da quercetina mostrou reduzir a capacidade dos flavonoides de inibir a XO. A rutina hidrolisada, formada predominantemente por Q3G, exibiu uma maior atividade antiproliferativa em várias células tumorais humanas, em especial células de glioma ($GI_{50} = 3,6 \mu\text{g/mL}$) e adenocarcinomas de ovário ($GI_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$) e mama ($GI_{50} = 2,3 \mu\text{g/mL}$) comparada à quercetina ($GI_{50} = 31,4, 72,7$ e $31,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e à rutina controle (antes da hidrólise), a qual não exibiu atividade antiproliferativa nas concentrações testadas (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados indicam que a Q3G, um derivado funcional da rutina com alta atividade antioxidante e antiproliferativa, pode ser eficientemente obtida a partir da hidrólise enzimática controlada da rutina.

Palavras-chave: quercetina-3-glicosídeo. rutina. atividade antioxidante. atividade antiproliferativa. hesperidinase. hidrólise.

ABSTRACT

Several reports and epidemiological evidences suggest that diets rich in quercetin glycosides and their derivatives have effects on the prevention and treatment of major diseases such as cardiovascular disease and cancer. The conversion of quercetin rutinose (rutin), a widely spread flavonoid in nature, to quercetin 3-glucoside (Q3G) by removal of the rhamnose molecule of rutin is an important strategy to increase its bioavailability. Q3G has scarce distribution in foods, so its intake from the diet is low and the processes for its isolation from natural matrices are less efficient. In this study, we evaluated the effectiveness of chemical (acid) hydrolysis and enzymatic hydrolysis catalyzed by the enzyme hesperidinase from *Penicillium* sp. for the synthesis of Q3G. The hesperidinase enzymatic complex, showing α -L-rhamnosidase activity (removal of the rhamnose molecule) and β -D-glucosidase activity (removal of the glucose molecule), was subjected to different heat treatments to inactivate the undesirable β -D-glucosidase activity. The hydrolysis kinetics of rutin and the quantification of reaction products were performed by liquid chromatography - mass spectrometry (UPLC - MS). Quercetin and rutin before and after hydrolysis were evaluated for their *in vitro* antioxidant activity by the DPPH radical scavenging method, the β -carotene bleaching method and inhibition of xanthine oxidase (XO) and for their antiproliferative activity using a panel of human tumor cells, using the sulforhodamine B assay to assess cell growth. It was possible to determine the best condition for the thermal inactivation of the β -D-glucosidase fraction of hesperidinase, which led to the attainment of high rates of Q3G (69.5%) after 4 hours of hydrolysis of rutin catalyzed by hesperidinase preheated at 70 °C for 30 minutes. Enzymatic hydrolysis showed to be advantageous in comparison to the chemical process, since it was possible to control the hydrolysis process while maintaining the glucose molecule esterified to quercetin. Hydrolyzed rutin (a mixture containing 69.5% Q3G and 7.5% quercetin) showed higher antioxidant activity evaluated by the DPPH radical scavenging method ($81.4 \pm 2.3\%$) in comparison to rutin ($62.6 \pm 6.9\%$, $p < 0.05$). There were no significant differences between the inhibition of lipid peroxidation, estimated by the β -carotene bleaching method, and inhibition of xanthine oxidase before and after hydrolysis of rutin. The presence of glycosidic substituents on the hydroxyl group (OH) at the 3-position in the C ring of quercetin was shown to reduce the capacity of flavonoids to inhibit XO. Hydrolyzed rutin, composed mainly by Q3G, exhibited a higher antiproliferative activity on various human tumor cells, especially glioma cells ($GI_{50} = 3.6$ mg/mL) and ovary ($GI_{50} = 1.5$ mg/mL) and breast adenocarcinomas ($GI_{50} = 2.3$ mg/mL) in comparison to quercetin ($GI_{50} = 31.4$, 72.7 and 31.9 mg/mL, respectively) and rutin (control, before hydrolysis), which did not exhibit antiproliferative activity at the concentrations tested (0.25, 2.5, 25 and 250 mg/mL). The results indicate that Q3G, a functional derivative of rutin with high antioxidant and antiproliferative activities, can be efficiently obtained by controlled enzymatic hydrolysis of rutin.

Keywords: quercetin-3-glucoside. rutin. antioxidant activity. antiproliferative activity. hesperidinase. hydrolysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Abs_c</i>	absorbância do controle
<i>Abs_{am}</i>	absorbância da amostra
<i>Abs₀</i>	absorbância da amostra no tempo zero
<i>Abs₁</i>	absorbância da amostra após a incubação
<i>Abs'₀</i>	absorbância do controle no tempo zero
<i>Abs'₁</i>	absorbância do controle após a incubação
ANOVA	análise de variância
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
C=O	grupamento carbonila
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazila
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
EC ₅₀	50% da concentração efetiva máxima
EM	espectrometria de massa
EMIQ	isoquercitrina enzimaticamente modificada
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> - ionização por spray de elétrons
FAS	ácido graxo sintetase
GI ₅₀	concentração necessária para reduzir em 50% o crescimento celular
GLUT2	transportador de glicose 2
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
¹ HMNR	ressonância nuclear magnética de hidrogênio
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima
<i>m/z</i>	razão massa-carga
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
PAF	fator de ativação plaquetária
OH	grupamento hidroxila
O ₂ ⁻	radical superóxido
Q3G	quercetina-3-glicosídeo
Ram/Gli	razão α-L-ramnosidase/β-D-glicosidase
ROO	radical peroxila
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBR	ensaio da sulforrodamina B
SFB	soro fetal bovino
SGLT1	transportador ativo de glicose sódio-dependente 1
TCA	ácido tricloroacético
TEAC	capacidade antioxidante equivalente a Trolox®
TGI	inibição total do crescimento
U	unidade de atividade enzimática

UPLC *Ultra Performance Liquid Chromatography*
Unicamp Universidade Estadual de Campinas
XO xantina oxidase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de flavonoides encontradas em alimentos	4
Tabela 2	Ocorrência de flavonoides em alimentos	5
Tabela 3	Relação entre a estrutura de flavonoides e seu potencial de inibição da xantina oxidase	9
Tabela 4	Processos enzimáticos de bioconversão de polifenóis isolados e presentes na matriz alimentar para obtenção de derivados funcionais	24
Tabela 5	Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa	38
Tabela 6	Atividades de α -L-ramnosidase e de β -D-glicosidase da hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp.	40
Tabela 7	Atividade antioxidante da rutina (controle), da rutina hidrolisada e da quercetina padrão determinada pelos métodos DPPH e β -caroteno	48
Tabela 8	Valores de inibição de crescimento celular (GI_{50}) (μ g/mL) de cada linhagem testada para a doxorubicina e amostras-teste	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da estrutura básica de um flavonoide (Santos-Buelga & Williamson, 2003)	3
Figura 2	Principais subclasses de flavonoides. A divisão é baseada em variações no anel heterocíclico C (Hollman & Katan, 1999)	5
Figura 3	Trânsito e metabolização dos flavonoides no organismo humano (adaptado de Spencer <i>et al.</i> , 2004)	14
Figura 4	Estruturas químicas da rutina, da quercetina-3-glicosídeo e da quercetina (Wang <i>et al.</i> , 2011)	18
Figura 5	Ação da hesperidinase sobre a rutina e a quercetina-3-glicosídeo. (A) atividade de α -L-ramnosidase. (B) atividade de β -D-glicosidase	27
Figura 6	Curva padrão de p-nitrofenolato a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ mol/mL	31
Figura 7	Esquema da aplicação das amostras na placa teste. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio). A segunda coluna cinza-escura representa o controle de células tumorais. As cores claras indicam as substâncias-teste, e as cores escuras representam o controle das substâncias-teste (branco da amostra) nas concentrações testadas	38
Figura 8	Estabilidades térmicas de α -L-ramnosidase e de β -D-glicosidase da hesperidinase avaliadas a 50, 60, 70 e 80°C por 30 minutos	41
Figura 9	Cinética de hidrólise ácida da rutina. Condições de reação de hidrólise descritas no item 4.6	43
Figura 10	Cinética de hidrólise enzimática da rutina utilizando hesperidinase sem tratamento térmico. Condições de reação de hidrólise descritas no item 4.5	43
Figura 11	Cinética de hidrólise enzimática da rutina utilizando hesperidinase com tratamento térmico (70°C por 30 minutos). Condições de reação de hidrólise descritas no item 4.5	44
Figura 12	Cromatogramas obtidos por CLAE – EM para as amostras de rutina hidrolisada com hesperidinase após 2 horas (A) e 4 horas (B) de reação enzimática. Condições de hidrólise descritas no item 4.5; condições de análise descritas no item 4.7.1	46
Figura 13	Espectros MS para a rutina padrão (A) e para a rutina hidrolisada com hesperidinase submetida a tratamento térmico (70°C – 30 minutos) (B) e (C). Condições de hidrólise descritas no item 4.5; condições de análise descritas no item 4.7.1	47
Figura 14	Efeitos inibitórios da rutina (controle), da quercetina padrão e da rutina hidrolisada obtida após 4, 8 e 12 horas de reação com hesperidinase na atividade da xantina oxidase	51

Figura 15 Atividade antiproliferativa da doxorubicina (A), rutina controle, 55
antes do tratamento enzimático (B), rutina hidrolisada com
hesperidinase (C) e quercetina padrão (D) em cultura de células
tumoriais humanas, relacionando porcentagem de crescimento e
concentração das amostras

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão bibliográfica	3
2.1	Flavonoides: estrutura e classificação	3
2.2	Atividades biológicas dos flavonoides	6
2.2.1	Atividade antioxidante	6
2.2.2	Atividade antiproliferativa	9
2.3	Metabolismo e biodisponibilidade dos flavonoides: influência da glicosilação	12
2.4	Rutina, quercetina-3-glicosídeo e quercetina	15
2.5	Hidrólise de flavonoides	21
2.5.1	Processos de hidrólise química de flavonoides	21
2.5.2	Processos de hidrólise enzimática de flavonoides	22
3	Objetivos	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	Materiais e métodos	29
4.1	Enzimas, padrões e reagentes	29
4.2	Cultura de células	29
4.2.1	Descongelamento das células	30
4.2.2	Congelamento das células	30
4.3	Determinação da atividade enzimática da hesperidinase	31
4.4	Cinética de inativação da β -D-glicosidase	32
4.5	Reação de hidrólise enzimática da rutina	32
4.6	Reação de hidrólise ácida da rutina	33
4.7	Métodos analíticos	33
4.7.1	Quantificação dos derivados de flavonoides por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM)	33

4.7.2.	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	34
4.7.2.1	Método de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH)	34
4.7.2.2	Método do descolorimento do β -caroteno	34
4.7.2.3	Inibição da xantina oxidase	35
4.7.2.4	Análise estatística dos dados da capacidade antioxidante	36
4.7.3	Atividade antiproliferativa - avaliação em painel de células tumorais humanas	36
4.7.3.1	Análise estatística dos dados de atividade antiproliferativa	39
5	Resultados e discussão	39
5.1	Atividade enzimática da hesperidinase de <i>Penicillium</i> sp.	39
5.2	Efeito do tratamento térmico na inativação da β -D-glicosidase da hesperidinase	40
5.3	Cinética de hidrólise da rutina e análise dos produtos de reação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CLAE - EM)	41
5.4	Influência da hidrólise da rutina na atividade antioxidante	48
5.5	Inibição da xantina oxidase da rutina antes e após hidrólise enzimática	51
5.6	Influência da hidrólise da rutina na atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	53
6	Perspectivas	57
7	Conclusão	58
8	Referências bibliográficas	59

1. INTRODUÇÃO

Os compostos polifenólicos presentes em vegetais, entre eles os flavonoides, têm sido objeto de estudo devido às suas propriedades funcionais, em especial sua atividade antioxidante, demonstrada em estudos *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos.

Dentre os flavonoides, um grupo de grande interesse devido às suas propriedades benéficas é a família da quercetina. A quercetina é uma aglicona, encontrada em vegetais principalmente na forma esterificada a diferentes açúcares. Dentre estes compostos, os de maior interesse são a isoquercitrina (quercetina-3-O-glicosídeo, Q3G), quercitrina (quercetina-3-O-L-ramnosídeo) e rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), a qual possui um dissacarídeo (rutinose = ramnose + glicose) como substituinte na hidroxila da posição 3 do anel C (pirano) (Kim *et al.*, 2011).

A natureza da glicosilação do flavonoide influencia tanto sua ação biológica quanto sua absorção pelo organismo. As formas agliconas dos flavonoides podem ser absorvidas diretamente a partir do intestino delgado (Heim *et al.*, 2002), enquanto as formas glicosídicas requerem hidrólise preliminar por enzimas intestinais ou pela microflora do cólon (Scalbert & Williamson, 2000). Embora o metabolismo intestinal propicie a retirada das frações glicosídicas dos derivados da quercetina, relatos bibliográficos mostram que a Q3G utilizada por via oral é melhor absorvida em relação à rutina e à quercetina, sendo por isso um composto de interesse para aplicação medicinal e alimentícia (Reinboth *et al.* 2010; Wang *et al.*, 2011). Sendo assim, a conversão da rutina em Q3G é uma estratégia importante para aumentar a sua biodisponibilidade (Olthof *et al.*, 2000).

Além disto, a Q3G apresenta algumas atividades biológicas importantes, como antioxidante, anti-inflamatória, atividade de proteção contra a aterosclerose e estabilização plaquetária (Wang *et al.*, 2011). Segundo alguns autores, os efeitos biológicos atribuídos à Q3G são superiores aos efeitos observados para a rutina (Salim *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Motoyama *et al.*, 2009).

A Q3G é um produto natural de distribuição escassa, presente em poucas fontes vegetais e em baixa concentração (em média, 0,01%), o que torna os processos de extração pouco eficazes (Wang *et al.*, 2011). Por outro lado, a rutina é amplamente distribuída e abundante entre diversos vegetais folhosos e frutas cítricas encontrados no mundo inteiro, como por exemplo, no trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (Kreft *et*

al., 1999), na uncária (*Uncaria eliptica*), nas folhas e pecíolos das espécies do gênero *Rheum* (Soponar *et al.*, 2010) e no fruto da árvore brasileira fava-d'anta (*Dimorphandra mollis*). A fava-d'anta é uma espécie arbórea nativa do Brasil, pertencente à família Caesalpinaceae, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na caatinga nordestina, que contém cerca de 8g de rutina para cada 100g de pericarpo (Chaves & Usberti, 2003). A rutina é encontrada ainda em várias fontes alimentares como cebola, uva, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (Wang *et al.*, 2010).

A obtenção da Q3G através da hidrólise da molécula de ramnose terminal da rutina se apresenta, dessa forma, como uma alternativa vantajosa tanto no aspecto econômico quanto tecnológico.

Existem duas metodologias básicas para síntese da Q3G a partir da rutina: a hidrólise química, em meio ácido ou alcalino, e a hidrólise enzimática, catalisada por α -L-ramnosidases (Monti *et al.*, 2004). A hidrólise enzimática apresenta vantagens sobre os métodos químicos, em especial quanto às condições de reação, mais brandas, e quanto à especificidade da reação. Somente duas preparações enzimáticas de α -L-ramnosidases estão disponíveis comercialmente, a hesperidinase e a naringinase, ambas produzidas por fungos e possuindo atividade tanto de α -L-ramnosidase quanto de β -D-glicosidase (Yadav *et al.*, 2010). A hesperidinase pode ser empregada na síntese de Q3G a partir da rutina; entretanto, neste processo a atividade de β -D-glicosidase do complexo enzimático é indesejada, uma vez que a molécula de glicose deverá permanecer esterificada à aglicona. Para eliminar a necessidade de purificação da fração de α -L-ramnosidase e reduzir o custo do método, uma das alternativas é recorrer à inativação da fração β -D-glicosidase da hesperidinase através de tratamento térmico seletivo, mantendo ao mesmo tempo a atividade de α -L-ramnosidase (Vila-Real *et al.*, 2011).

Assim, este estudo tem como objetivo principal analisar comparativamente as atividades antioxidante e antiproliferativa da rutina antes e após hidrólise enzimática pela hesperidinase comercial de *Penicillium* sp. O complexo enzimático foi submetido a diferentes tratamentos térmicos para avaliar o efeito da temperatura na inativação da fração β -D-glicosidase e otimizar a obtenção de Q3G a partir da rutina comercial. O processo enzimático foi ainda comparado ao processo de hidrólise química em meio ácido em relação à cinética de conversão de rutina em Q3G.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Flavonoides: estrutura e classificação

Entre as diversas classes de compostos fenólicos, os flavonoides são considerados muito importantes para a alimentação humana, devido a sua ampla distribuição em frutas, hortaliças, legumes, grãos, cereais e leguminosas. Sua biossíntese pelos vegetais é estimulada pela luz; desta forma, esses compostos se acumulam nos tecidos aéreos (Archivio *et al.*, 2007).

A estrutura dos flavonoides, representada na Figura 1, é baseada no núcleo *flavilium*, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel (A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (C), que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O anel C pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou pró-antocianinas ou catequinas) e antocianidinas, e é denominado de núcleo flavana (Aherne & O'Brien, 2002).

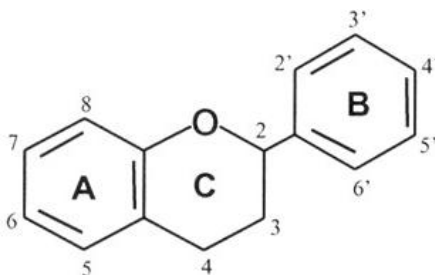


Figura 1. Representação esquemática da estrutura básica de um flavonoide (Santos-Buelga & Williamson, 2003)

Flavonoides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos. Exceto o grupo das leucoantocianinas, os flavonoides em plantas geralmente são acompanhados por glicídios, recebendo assim a denominação de *glico-flavonoides* ou *flavonoides glicosilados*. As substituições glicídicas incluem D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose, lignina e arabinose (Birt *et al.*, 2001). O resíduo de açúcar da molécula do flavonoide é provavelmente o principal fator determinante de sua absorção

pelo organismo (Nielsen *et al.*, 2006). Quando se apresenta isenta de glicídios (açúcares), a estrutura recebe o nome de *aglicona*. A forma aglicona é mais lipofílica, facilitando a interação com as membranas celulares (Salem *et al.*, 2010).

Variações no anel heterocíclico C originam as diversas classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides, como pode ser visto na Tabela 1 e na Figura 2.

A estrutura básica dos flavonoides origina vários padrões de substituição nos anéis A e B dentro das classes dos flavonoides: grupamentos hidroxila (OH) fenólicos, O-açúcares, grupos metóxi, sulfatos e glucoronídeos (Hollman & Katan, 1999). As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações.

Tabela 1. Principais classes de flavonoides encontradas em alimentos

Classe	Estrutura	Exemplos
Flavonas	C=O na posição 4	luteolina, apigenina, diosmetina
Flavonóis	OH na posição 3 e C=O na posição 4 do anel C	quercetina, kaempferol, miricetina
Flavanonas	C=O no C-4, sem dupla ligação entre C-2 e C-3	naringina, hesperidina
Flavanóis	OH no C-3, sem dupla ligação entre C-2 e C-3, sem C=O no C-4	catequinas
Antocianidinas	OH no C-3, com ligações duplas conjugadas, sem C=O no C-4	cianidina, pelargonidina
Isoflavonas	anel B na posição C-3	genisteína, daidzeina

OH = grupamento hidroxila; C=O = grupamento carbonila

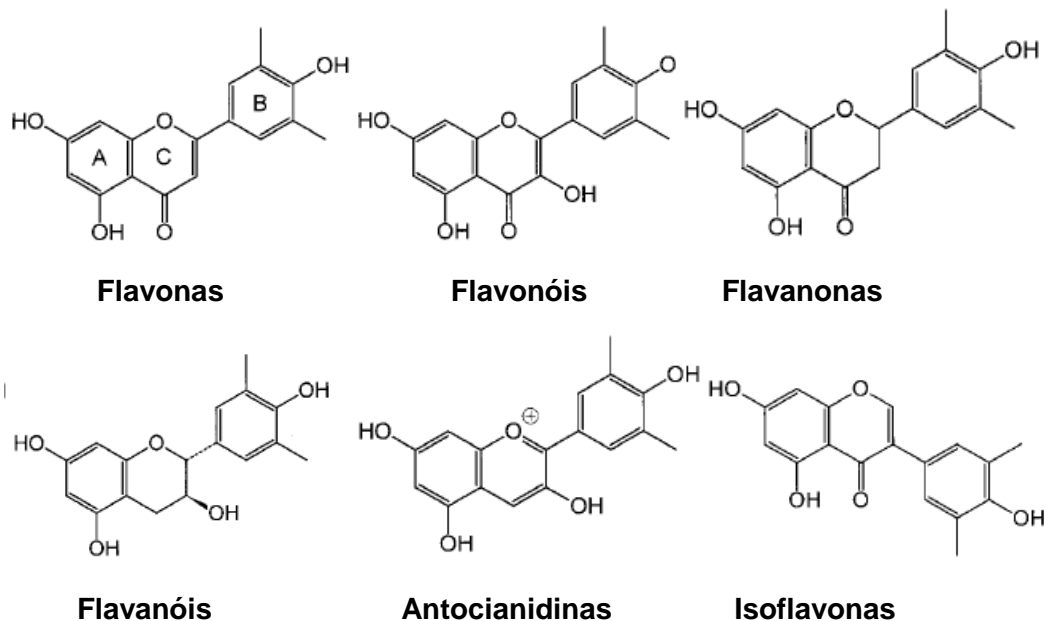


Figura.2. Principais subclasses de flavonoides. A divisão é baseada em variações no anel heterocíclico C (Hollman & Katan, 1999)

Na Tabela 2 encontram-se as principais classes de flavonoides e sua ocorrência em alimentos comuns.

Tabela 2. Ocorrência de flavonoides em alimentos

Classe de flavonoides	Principais fontes
flavonóis	cebola, couve-de-folhas, brócolis maçã, cereja, bagas (framboesa, amora, mirtilo, morango, oxicoco) chá, vinho tinto
flavonas	salsa, tomilho
flavanonas	frutas cítricas
catequinas	maçã chás
antocianidinas	cereja, uva
isoflavonas	soja, leguminosas

(Adaptado de Hollman & Katan, 1997)

2.2. Atividades biológicas dos flavonoides

2.2.1. Atividade antioxidante

Um dos mais importantes mecanismos de ação dos flavonoides se deve às suas propriedades antioxidantes. Segundo Halliwell & Gutteridge (1998), o termo “antioxidante” é aplicado a substâncias capazes de retardar, prevenir ou remover o dano oxidativo a uma molécula-alvo. O papel fisiológico desses compostos, como a definição sugere, é prevenir danos a componentes celulares que surgem como consequência de reações químicas envolvendo radicais livres.

Os flavonoides podem prevenir danos causados por radicais livres através dos seguintes mecanismos: neutralização direta de espécies reativas de oxigênio; ativação de enzimas antioxidantes; quelação de metais; redução de radicais α -tocoferil; inibição de oxidases; mitigação do estresse oxidativo causado pelo óxido nítrico; aumento nos níveis de ácido úrico e aumento da atividade de antioxidantes de baixo peso molecular. A capacidade antioxidante de alguns flavonoides, como a epigallocatequina galato, é muitas vezes superior à das vitaminas C e E, e comparável à do α -tocoferol (Procházková *et al.*, 2011).

A estrutura química dos flavonoides apresenta três requisitos possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercida por esta classe de compostos: (1) presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos elétrons. Este grupo constitui o principal fator que controla a eficiência dos flavonoides como quelantes de oxigênio singlete (Tournaire *et al.*, 1993); (2) ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, que aumenta deslocalização eletrônica a partir do anel B; (3) grupos OH nas posições 3' e 5' com função oxo, que promovem a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (Silva *et al.*, 2002). O OH na posição 3' é um dos fatores responsáveis pela reatividade do flavonoide com oxigênio singlete (Tournaire *et al.*, 1993).

A atividade antioxidante de um flavonoide é, então, determinada principalmente pelo anel B, enquanto a restante estrutura base tem apenas uma pequena influência. Isto se verifica devido a uma maior capacidade eletrodoadora deste anel, havendo uma maior influência da restante estrutura base com o decréscimo de atividade antioxidante do anel

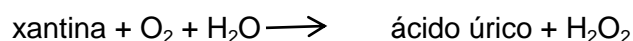
B. O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula contribui de forma significativa para a atividade antioxidante destes compostos (Heim *et al.*, 2002).

Compostos fenólicos, entretanto, podem exercer efeitos pró-oxidantes. O comportamento antioxidante/pró-oxidante pode ser determinado por muitos fatores, como a concentração e a natureza dos íons de metais de transição presentes, a concentração dos compostos fenólicos e o pH (Simic *et al.*, 2007).

Cao *et al.* (1997) investigaram o comportamento antioxidante de alguns flavonoides, relacionando-o com sua estrutura. Flavonas, isoflavonas e flavanonas mostraram atividade antioxidante contra radicais peroxila (ROO) e OH, porém tiveram atividade pró-oxidante na presença de íons Cu^{2+} . Flavonoides contendo múltiplas substituições OH mostraram atividades antirradicais peroxila várias vezes maiores do que o Trolox®, um análogo do α -tocoferol. A simples substituição OH na posição 5" não promoveu atividade antioxidante, ao passo que a substituição di-OH nas posições 3" e 4" se mostrou particularmente importante para a capacidade de absorção de radicais ROO do flavonoide.

A atividade de neutralização de radicais atribuída aos flavonoides é capaz de afetar várias etapas da cascata de araquidonato via ciclo-oxigenase ou lipoxigenase (Abad *et al.*, 1995; Robak & Gryglewski, 1996). Além destes efeitos importantes, os flavonoides possuem propriedades de estabilização de membranas e também afetam alguns processos do metabolismo intermediário (Bombardelli & Morazzoni, 1993).

Os flavonoides inibem enzimas responsáveis pela produção de íons superóxido (O_2^-), tais como a xantina oxidase (XO) e a proteína quinase C (Hanasaki *et al.*, 1994). A XO é uma enzima envolvida no metabolismo de purinas, catalisando a oxidação da hipoxantina e da xantina em ácido úrico. Durante a reoxidação da XO, o O_2 molecular age como acceptor de elétrons, produzindo radicais O_2^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme representado abaixo (Cos *et al.*, 1998):



Os radicais O_2^- promovem danos oxidativos em tecidos e estão, desta forma, envolvidos em vários processos patológicos como inflamação, aterosclerose, câncer e envelhecimento (Paravicin & Touyz, 2008). Uma das conseqüências desse processo é uma condição inflamatória conhecida como gota, caracterizada por depósitos de cristais

de urato de sódio, denominados tofos, nos tecidos, especialmente articulações. Danos relacionados à reperfusão em tecidos isquêmicos, caracterizados pela superprodução de íons O_2^- , também estão associados à atividade da XO (Cotelle *et al.*, 1996).

O alopurinol, um potente inibidor da XO comumente utilizado na terapia de pacientes com hiperuricemia, pode ocasionar efeitos adversos relacionados à hipersensibilidade. Essa reação imunológica é caracterizada por múltiplas alterações, tais como febre, erupções cutâneas, prejuízo da função renal, injúria hepatocelular, leucocitose e eosinofilia, com consequências muitas vezes fatais (Singer & Wallace, 1986). Desta forma, se faz necessária a busca por novos inibidores da XO que demonstrem eficácia comparável à do alopurinol, porém com efeitos adversos menos significativos. Sob tal perspectiva, os flavonoides representam uma alternativa promissora.

A inibição da produção de íons O_2^- no sistema xantina/XO por flavonoides pode ser atribuída tanto à sua atividade de neutralização de radicais quanto à inibição da XO. Segundo Cotelle *et al.* (1996), a presença de uma substituição OH na posição C-7 induz à inibição desta enzima, associada à presença de um grupo catecol no anel B da estrutura do flavonoide, importante para a atividade antioxidante e de neutralização de radicais exercida por alguns flavonoides.

Pesquisas apontam que a quercetina e a silibina possuem atividade inibitória da XO, resultando em um declínio do dano oxidativo (Nijveldt *et al.*, 2001; Shoskes, 1998; Chang *et al.*, 1993; Iio *et al.*, 1986).

Selloum *et al.* (2001) relataram que a quercetina, a miricetina e o kaempferol inibiram significativamente a formação de ácido úrico por ação da XO.

Lin *et al.* (2002) estudaram, através de modelagem molecular, a capacidade de inibição da XO por diversos flavonoides. Os autores relataram que todos os compostos investigados se comportaram como inibidores competitivos da enzima. A apigenina foi o inibidor mais eficiente, tendo demonstrado a interação flavonoide-sítio ativo da enzima mais favorável, e os flavonoides com atividade inibitória mais baixa foram aqueles que possuíam maiores resíduos glicosídicos, como a isovitexina.

Cos *et al.* (1998) conduziram um estudo a respeito da relação estrutura-atividade inibitória da XO de alguns flavonoides. Os resultados de atividade de inibição da XO, representados como IC_{50} , podem ser visualizados na Tabela 3. A substituição di-OH nas posições 5 e 7, simultaneamente à presença de dupla ligação entre C-2 e C-3 (requisitos

presentes em flavonas, como a apigenina e a luteolina, e em flavonóis, como o kaempferol e a quercetina, conforme mostrado na Figura 2), são essenciais para a alta atividade de inibição da XO, segundo os autores.

Tabela 3. Relação entre a estrutura de flavonoides e seu potencial de inibição da xantina oxidase

Nome sistemático	Classe	Posição dos OH	IC ₅₀ (µm/L)
catequina	catequina	3, 5, 7, 5'	> 100
epigallocatequina	catequina	3, 5, 7, 5'	> 100
naringenina	flavanona	7	> 50
4'-hidroxiflavanona	flavanona	4	> 30
kaempferol	flavonol	3, 5, 7, 4'	2,5
quercetina	flavonol	3, 5, 7, 3', 4'	1,5
apigenina	flavona	5, 7, 4'	1,0
luteolina	flavona	5, 7, 3', 4'	0,75

(Adaptado de Cos *et al.*, 1998)

2.2.2. Atividade antiproliferativa

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se, através do processo de metástase, para outras regiões do corpo (INCA, 2012). Devido à rápida divisão celular, essas células apresentam um caráter altamente agressivo e incontrolável, o que leva a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas.

O aumento da incidência do câncer no Brasil provoca, a cada ano, uma elevação dos gastos públicos, tanto com o tratamento quanto com o combate a esta doença. As estimativas do país para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de mais de 518 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Entre

os tipos mais incidentes estão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (INCA, 2012).

A quimioterapia é um dos métodos mais empregados para o tratamento do câncer, consistindo na utilização de compostos químicos, denominados quimioterápicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral.

Um dos grandes problemas dos medicamentos quimioterápicos atuais é a sua não especificidade para células tumorais, sendo também tóxicos para células normais. Problemas relacionados à ineficiência dos fármacos existentes frente a diferentes tipos de câncer, bem como o aumento do aparecimento de linhagens resistentes a estes medicamentos, são também relatados (Chabner & Roberts, 2005). Desta forma, a busca por novos quimioterápicos para o tratamento do câncer continua despertando grande interesse.

Entre os potenciais quimioterápicos estudados recentemente, grande destaque tem sido dado aos flavonoides. Esses compostos são reconhecidos como agentes quimiopreventivos e inibidores da progressão de tumores (Hsu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Entre os potenciais efeitos antitumorais de flavonoides isolados e de extratos vegetais contendo essa classe de compostos, destacam-se a atividade antiproliferativa, a suspensão do ciclo celular de linhagens tumorais e/ou a indução da apoptose através de sua atividade pró-oxidante (Loa *et al.*, 2009; Pierini *et al.*, 2008, Archivio *et al.*, 2007).

Entre os mecanismos propostos para os efeitos antiproliferativo e antitumoral exercidos pelos flavonoides estão aqueles envolvendo a modificação de enzimas que ativam ou detoxificam carcinógenos e aqueles relacionados à alteração de vias de sinalização celular (Moon *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2010). A modulação por flavonoides de enzimas metabolizadoras de drogas, como o sistema do citocromo P450, é importante porque estas enzimas podem inativar carcinógenos, contribuindo para a prevenção do câncer, e também aumentar ou diminuir o metabolismo de drogas quimioterápicas (Moon *et al.*, 2006). Diversos flavonóis e flavonas promovem inibição do tipo competitiva, atuando como substratos para a isoforma CYP2C9 do sistema P450 (Si *et al.*, 2009). Alguns flavonoides são capazes de inibir enzimas relacionadas à regulação celular, como topoisomerasas, quinases dependentes de ciclinas e proteína quinases (Brusselmans *et al.*, 2005).

Lambert & Elias (2010) relataram que a atividade pró-oxidante das catequinas é responsável pela indução da apoptose em células tumorais, e também é capaz de induzir sistemas antioxidantes endógenos em tecidos normais, oferecendo proteção contra danos carcinogênicos. Em contraste, Leung *et al.* (2006) relataram que a indução da apoptose de células CH27 (carcinoma de pulmão) pela luteolina foi acompanhada pela ativação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase, e não pela produção de espécies reativas de oxigênio ou alteração do potencial da membrana mitocondrial. Assim, os efeitos antiproliferativos da luteolina em células tumorais parecem resultar de sua atividade antioxidante, e não pró-oxidante.

Brusselmans *et al.* (2005) estudaram o efeito antiproliferativo de diversos flavonoides, entre eles a quercetina, relacionando tais efeitos com a capacidade inibitória da ácido graxo sintetase (FAS), enzima responsável pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa. Esta enzima se apresenta em níveis muito elevados, em relação a células normais, em diversos tumores, como próstata, mama, ovário, endométrio, cólon e pulmão. Os autores relataram que após 5 horas de exposição à quercetina em baixa concentração (6 μ M), a síntese lipídica em células de tumor de próstata (linhagem LNCaP) e de tumor de mama (MDA-MB 231) foi marcadamente reduzida. Concentrações maiores causaram maiores níveis de inibição, de forma dose-dependente. Como consequência da ação da quercetina, as células tumorais apresentaram alterações na estrutura da membrana, como perda de adesão e formação de extrusões celulares, inibição da proliferação e indução da apoptose via expressão de caspases. Além disso, estudos em fibroblastos normais mostraram que a quercetina não afetou a proliferação ou a viabilidade dessas células, indicando que a ação da quercetina na inibição da FAS é seletiva para células tumorais. Os autores relatam que a presença de uma dupla ligação na posição C2-C3, um grupo funcional 4-cetona e grupos OH nas posições 5, 7, 3' e 4' favorecem a inibição da lipogênese por flavonoides.

Galluzzo *et al.* (2009) estudaram os efeitos da quercetina nos mecanismos moleculares implicados na geração de cascatas apoptóticas em células de carcinoma cervical (HeLa). A quercetina induziu a morte celular através de um mecanismo dependente de receptores de estrógeno α , envolvendo a ativação da caspase-3 e da quinase p38.

Concluindo, com base no exposto acima, diversas moléculas e vias têm sido reportadas como alvos de ação dos flavonoides, e é possível afirmar que o mecanismo

preciso pelo qual esses compostos exercem seus efeitos protetores contra o câncer ainda é pouco compreendido, sendo necessárias mais investigações acerca do tema.

2.3. Metabolismo e biodisponibilidade dos flavonoides: influência da glicosilação

A absorção de flavonoides é variável, pois a diversidade estrutural destes compostos influencia em sua absorção intestinal e, conseqüentemente, em sua biodisponibilidade e propriedades biológicas. Flavonoides comuns na dieta humana, como catequinas, proantocianidinas e antocianinas, não são necessariamente os de maior atividade biológica, por razões como baixa atividade intrínseca, absorção intestinal reduzida, alta metabolização e rápida excreção (Scalbert & Williamson, 2000).

Os flavonoides em sua forma aglicona são facilmente absorvidos pelo intestino delgado; entretanto, a maioria desses compostos está presente em alimentos na forma de 3-O-glicosídeos e polímeros (Heim, 2002). Até recentemente, aceitava-se que flavonoides glicosídicos permaneciam íntegros até alcançarem o cólon, onde ocorre a remoção do açúcar catalisada por enzimas da microflora intestinal (glicosidases). No entanto, estudos de intervenção indicaram que o sítio primário de absorção de alguns flavonoides glicosídicos é o intestino delgado (Hollman & Katan, 1997; Graefe *et al.*, 2001). Já os flavonoides ramnosídicos necessitam ser hidrolisados pelas ramnosidases da microflora colônica (Hollman *et al.*, 1999).

A absorção no cólon ocorre mais lentamente e com menor intensidade se comparada ao intestino delgado, provavelmente devido a sua menor área de exposição e à baixa atividade dos transportadores de membrana. O fato de glicosídeos ligados a ramnose serem absorvidos mais lentamente e com menor eficácia do que as formas agliconas ou glicosiladas comprova essa afirmação. Em ratos e humanos, por exemplo, a absorção da rutina é mais lenta e menos eficiente se comparada à quercetina-4-O-glicosídeo (um derivado da quercetina formado pela glicosilação da forma aglicona na posição C-4) e à quercetina aglicona (Hollman *et al.*, 1999; Arts *et al.*, 2004; Erlund *et al.*, 2002; Morand *et al.*, 2000), sendo a biodisponibilidade da rutina em torno de 15 a 20% da quercetina-4-O-glicosídeo (Hollman & Katan, 1997).

A quercetina glicosilada é mais rapidamente absorvida no intestino delgado (Cornard *et al.*, 1999; Wach *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2005), independentemente da posição da glicose. A quercetina-3-glicosídeo (Q3G) e a quercetina-4'-glicosídeo

apresentam alta biodisponibilidade, sendo a meia vida plasmática da Q3G de $18,5 \pm 0,8$ horas e a da -4'-glicosídeo de $17,7 \pm 0,9$ horas. Seus picos de concentração plasmática são de $5,0 \pm 1,0 \mu\text{mol/L}$ para a Q3G e $4,5 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$ para a -4'-glicosídeo, ocorrendo $37,0 \pm 12,0$ min após a ingestão da primeira e $27,0 \pm 5,0$ min após a ingestão da segunda. O pico da concentração plasmática da rutina, por sua vez, ocorre apenas $7,0 \pm 2,9$ horas após sua ingestão. A conversão da quercetina rutinosídeo em glicosídeo, portanto, é uma estratégia importante para aumentar a sua biodisponibilidade nos alimentos (Olthof *et al.*, 2000).

Graefe *et al.* (2001) observaram que a quercetina presente na cebola, que geralmente se apresenta sob a forma de glicosídeos, foi absorvida com maior rapidez e eficácia, quando comparada à quercetina presente na maçã, que contém vários outros açúcares ligados, além da glicose. Os autores sugeriram que o mecanismo pelo qual a glicosilação facilita a absorção da quercetina parece estar relacionado com os transportadores de hexoses, especialmente o SGLT1 (transportador ativo de glicose sódio-dependente 1), que seria responsável por levar a forma glicosilada da quercetina para o interior do enterócito, no qual esta sofreria a ação das glicosidases citosólicas. Segundo Mizuma *et al.* (1992), a conjugação de uma glicose a um composto fenólico resulta em absorção ativa a partir do lado da mucosa até o lado da serosa pelo sistema de transporte de glicose. Wolfram *et al.* (2002) conduziram um estudo *ex vivo*, utilizando jejunos e cólons proximais de ratos incubados com soluções de flavonoides, que corrobora essa afirmação.

É possível que os resíduos de açúcar de flavonoides ligados à arabinose ou à xilose sejam também hidrolisados no cólon, mas esta questão ainda não foi estudada em detalhes (Hollman & Katan, 1999).

Outro caminho de absorção de polifenóis foi sugerido, envolvendo uma enzima presente na membrana da borda em escova do intestino delgado, a lactase florizina hidrolase, uma glicosidase que catalisa a hidrólise extracelular de alguns glicosídeos. Após a hidrólise, ocorre difusão passiva da forma aglicona pela membrana da borda em escova (Day *et al.*, 2003). Caso o flavonoide glicosilado atinja o interior do enterócito ou do hepatócito (através de transporte ativo, por receptores SGLT1), a β -glicosidase citosólica hidrolisará a molécula, formando os flavonoides na forma livre, que posteriormente serão conjugados e entrarão na corrente sanguínea (Németh *et al.*, 2003).

Após sua absorção, os flavonoides sofrerão reações metabólicas, como pode ser visto no esquema mostrado na Figura 3. Na fase I das reações metabólicas, um grupo funcional, por exemplo, um OH, é acrescentado à molécula, ou o grupo funcional da molécula é exposto através de reações de biotransformação (Yan & Caldwell, 2001). As enzimas da família do citocromo P450 são as mais importantes da fase I. As reações da fase II são reações de conjugação, ocorridas no intestino delgado e no fígado, e entre elas podemos citar a glicuronização, a sulfatação e a metilação. Nessas reações, um produto endógeno, como ácido glicurônico, sulfato ou glutatona, é transferido ao grupo funcional formado na fase I do metabolismo. Em alguns casos, a conjugação ocorre diretamente no substrato não modificado. Os flavonoides podem também ser metabolizados a pequenos compostos fenólicos.

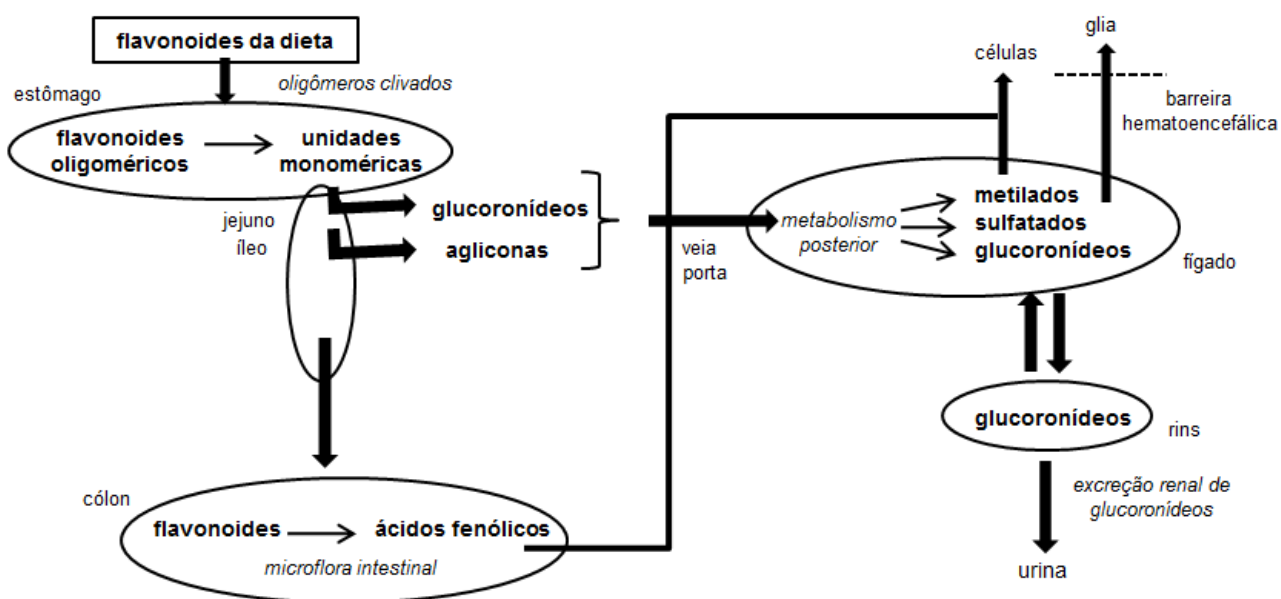


Figura 3. Trânsito e metabolização dos flavonoides no organismo humano (adaptado de Spencer *et al.*, 2004)

Os metabólitos dos flavonoides, encontrados no sangue, em órgãos alvo ou como resultado da atividade digestiva e hepática, podem diferir das formas nativas dos compostos com relação à atividade biológica. Além disso, as modificações na estrutura dos flavonoides podem facilitar a sua eliminação do organismo, devido ao aumento de

sua polaridade. Assim, muitos desses metabólitos podem ser detectados na urina e nas fezes humanas (Walle *et al.*, 2003). Altas taxas de excreção dos metabólitos nas fezes indicam baixa absorção dos flavonoides pelo organismo (Manach *et al.*, 2005). Baixos valores de excreção urinária podem ser indicativos de excreção pronunciada pela bile, ou ainda de metabolismo intenso.

Os metabólitos glicuronizados e sulfatados são mais comuns no organismo se comparados aos metilados (Kroon *et al.*, 2004). No entanto, uma mesma molécula pode sofrer diferentes processos de metabolização (Yang *et al.*, 2008). O tipo de metabolização depende da dose ingerida e da natureza da molécula (Manach *et al.*, 2004).

O tempo de meia-vida dos polifenóis no plasma é de, aproximadamente, 2 horas para antocianinas, 2 a 3 horas para flavanóis, 4 a 8 horas para isoflavonas e 11 a 28 horas para flavonóis, como a quercetina. Já a epicatequina galato possui eliminação mais lenta, possivelmente devido à sua alta excreção biliar, que permite sua alta reabsorção no intestino delgado juntamente com a bile, ou à sua grande complexidade com as proteínas plasmáticas (Manach *et al.*, 2004).

2.4. Rutina, quercetina-3-glicosídeo e quercetina

A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) é um glicosídeo conjugado, pertencente à classe dos flavonóis, formado pela forma aglicona, a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi-flavona) ligada na posição C2 do anel C a uma molécula dissacarídica, a rutinose (C₁₂H₂₂O₁₀), que é composta por uma molécula de ramnose e uma de glicose (Williamson *et al.*, 1996).

A rutina e seus derivados representam cerca de 95% do total de flavonoides ingeridos, estando presentes em altas concentrações na cebola, na maçã, no brócolis, no vinho, no chá (Hertog *et al.*, 1993), nos frutos de fava d'anta (*Dimorphandra* sp.) (planta do cerrado brasileiro) (Chaves & Usberti, 2003), em cascas de frutas cítricas (laranja, toranja, limão, lima) (Bilbao *et al.*, 2007) e em outras frutas, como o mirtilo (Kähkönen *et al.*, 2001).

A quercetina é encontrada em altas concentrações na cebola (284-486 mg/ kg), couve (100 mg/kg), vagem (32-45 mg/ kg), brócolis (30 mg/ kg), repolho (14 mg/ kg) e tomate (8mg/ kg). Entre as frutas, grandes concentrações de quercetina são encontradas na maçã (21-72 mg/ kg). No vinho tinto, o teor de quercetina varia entre 4 -16 ml/ L. O chá

preto é a bebida que apresenta maior concentração de quercetina, em torno de 10-25 mg/L (Hertog *et al.*, 1993).

Estudos relataram que a rutina possui várias propriedades farmacológicas, tais como: atividade antioxidante (Boyle *et al.*, 2000) com alto potencial de neutralização de radicais OH e O₂⁻ (Bombardelli & Morazzoni, 1993; Oomah & Mazza, 1996; Metodiewa *et al.*, 1997) e inibição da peroxidação lipídica (Negré-Salvayre *et al.*, 1991), além das atividades citoprotetora (Potapovich & Kostyuk, 2003), vasoprotetora (Ihme *et al.*, 1996; Lindahl & Tagesson, 1997; Tang *et al.*, 2011), antiproliferativa (Santos *et al.*, 2011, Kuntz *et al.*, 1999), antitrombótica (Sheu *et al.*, 2004) e cardioprotetora (Ziaee *et al.*, 2009). A rutina é capaz de diminuir a permeabilidade capilar, exercendo efeito vasoconstritor sobre os vasos sanguíneos periféricos e inibindo o conteúdo de fator de ativação plaquetária (PAF) (Izzo *et al.*, 1994). Tem sido relatado que a rutina previne ulcerações na mucosa gástrica em diversos modelos animais (La Casa *et al.*, 2000; Pérez-Guerrero *et al.*, 1994).

Experimentos em ratos e em culturas de células relataram o potencial da rutina e da quercetina na inibição da neoplasia colônica (Pereira *et al.*, 1996; Lipkin *et al.*, 1999). Deschner *et al.* (1991), utilizando modelos experimentais de ratos com tumores de cólon induzidos por azoximetano, observaram que os grupos experimentais tratados com dietas enriquecidas em 2% de quercetina ou 4% de rutina tiveram redução significativa na proliferação celular. Além disso, a rutina e a quercetina foram capazes de inibir a fase S do ciclo celular e de reduzir significativamente as áreas focais de displasia. A incidência de tumores de cólon nos animais tratados foi reduzida em cerca de 4 vezes com o tratamento com quercetina e em 2 vezes com o tratamento com rutina. Ambos os flavonoides foram capazes de inibir a multiplicidade dos tumores, isto é, menores números de tumores por animal surgiram nos grupos tratados. Yang *et al.* (2000), utilizando o mesmo modelo experimental, verificaram que os animais que receberam dietas suplementadas com quercetina ou rutina exibiram um aumento nas taxas de apoptose das células tumorais, com redução nas áreas focais de displasia.

Roseghini *et al.* (2009) utilizaram células B de hibridoma murino em um estudo *in vitro* para avaliação da atividade antiproliferativa da rutina, reportando que esse flavonoide aumenta a taxa de apoptose em até cinco vezes, ao mesmo tempo reduzindo a proliferação celular e ainda induzindo a necrose do tecido tumoral.

A quercetina possui importantes propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antiproliferativas (Nijveldt *et al.*, 2001), além de ser um eficiente inibidor da XO. A

quercetina é considerada um excelente antioxidante neutralizador de radicais livres, mesmo nos casos em que essa atividade depende da disponibilidade intracelular de glutatona reduzida.

Efeitos inibitórios da quercetina têm sido relatados em linhagens celulares de glioma humano e murino (Braganhol *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006), e ainda em linhagens humanas de glioblastoma, um tumor cerebral altamente proliferativo e invasivo (Santos *et al.*, 2011). Em humanos, foi relatado que a rutina suprime a proliferação de células de tumor de próstata andrógeno-independente (Knowles *et al.*, 2000).

Além de sua atividade antioxidante, a quercetina exerce um efeito próapoptótico direto em células tumorais, podendo efetivamente bloquear o crescimento de várias linhagens celulares de câncer em diferentes fases do ciclo celular. Estudos demonstram que a quercetina é capaz de regular o ciclo celular, interagir com os locais de ligação do estrógeno tipo II, diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais (Xiao *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 1990).

Kawaii *et al.* (1999) estudaram a inibição da proliferação de várias linhagens celulares de tumores (A549, carcinoma de pulmão humano; B16, melanoma 4A5 de camundongo; CCRF-HSB-2, células T de leucemia humana e TGBC11TKB, células de linfonodos metastáticos de câncer gástrico humano) por vinte e sete flavonoides cítricos. A quercetina apresentou alto potencial antiproliferativo, menor apenas que a da luteolina e da natsudaidaina. Apesar do efeito altamente citotóxico exercido sobre células tumorais, a quercetina não demonstra efeitos danosos em células normais (Gibellini *et al.*, 2010).

A Q3G (também chamada de isoquercitrina) é composta pela quercetina ligada a uma molécula de glicose. Como pode ser visto na Figura 4, existe uma similaridade estrutural entre a quercetina, a Q3G e a rutina, e por isso os três compostos exibem atividades biológicas em comum, incluindo os efeitos antiproliferativos em diversas linhagens tumorais, propriedades anti-inflamatórias e antialérgicas, atividade antioxidante e efeitos na prevenção de doenças ateroscleróticas (Wach *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Motoyama *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2005; Erlund, 2004; Seyoum *et al.*, 2006).

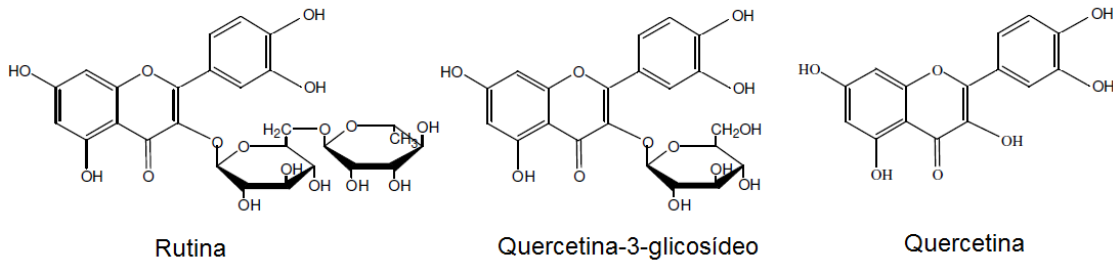


Figura 4. Estruturas químicas da rutina, da quercetina-3-glicosídeo e da quercetina (Wang *et al.*, 2011)

Jo *et al.* (2010) conduziram um estudo a respeito das propriedades inibitórias da rutina, da quercetina e da Q3G sobre as α -glicosidases, enzimas responsáveis pela hidrólise de carboidratos e, conseqüentemente, pela hiperglicemia pós-prandial que ocorre no diabetes mellitus não-dependente de insulina. Os autores relataram que a quercetina e seus derivados são inibidores da isomaltase ainda mais potentes do que a acarbose, fármaco empregado regularmente como redutor da glicemia.

Outro efeito biológico atribuído à rutina, à quercetina e à Q3G é a atividade antiparasitária contra os gêneros *Toxoplasma* (Weiss *et al.*, 1998), *Trypanosoma* (Mamani-Matsuda *et al.*, 2004) e *Leishmania* (Kirmizibekmez *et al.*, 2004; Mittra *et al.*, 2000; Sen *et al.*, 2005). Ganesh *et al.* (2012) investigaram a atividade de diversos flavonoides contra o *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária. Entre os compostos investigados, a rutina demonstrou maior atividade tanto em isolados de campo quanto em culturas em laboratório.

Apesar das similaridades estruturais, existem algumas diferenças notáveis entre os três compostos quanto a suas propriedades físicas, químicas e biológicas (Seyoum *et al.*, 2006). A quercetina é geralmente acumulada em plantas sob a forma glicosilada, como glicosídeos, rutinosídeos e xilosídeos (Mauludin *et al.*, 2009). Essas formas glicosiladas da quercetina mostram maior solubilidade em água quando comparadas à quercetina aglicona, devido à hidrofiliabilidade dos resíduos glicosídicos, que contêm OH (Aherne & O'Brien, 2002).

Em comparação com a rutina e a quercetina, a Q3G administrada via oral é melhor absorvida (Arts *et al.*, 2004; Motoyama *et al.*, 2009; Salim *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005). Erlund (2004) relatou que a biodisponibilidade da quercetina administrada em cápsulas é inferior a 1% em humanos. Outros estudos demonstram que a

biodisponibilidade da Q3G é 1,5 vez superior à da quercetina em cães (Reinboth *et al.*, 2010) e também em ratos (Morand *et al.*, 2000). Evidências experimentais sugerem que a Q3G pode ser transportada pelo SGLT1 e subsequentemente desglicosilada no interior do enterócito pela β -glicosidase citosólica (Arts *et al.*, 2002; Walgren *et al.*, 2000), conforme exposto no item 2.3. A quercetina, por sua vez, não é transportada pelo SGLT1 ou pelo transportador de glicose 2 (GLUT2) (Kwon *et al.*, 2007).

O pico de concentração plasmática da Q3G ocorre 37 ± 12 minutos após sua ingestão, e é de $5,0 \pm 1 \mu\text{mol/L}$, e sua meia-vida plasmática é de $18,5 \pm 0,8$ h (Olthof *et al.*, 2000).

Alguns estudos farmacológicos têm demonstrado que certas atividades biológicas da Q3G, como alelopática, antioxidante, anti-inflamatória, proteção contra a aterosclerose e estabilização plaquetária, são superiores às da rutina (Salim *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Motoyama *et al.*, 2009).

Rogério *et al.* (2007) conduziram um estudo a respeito dos efeitos anti-inflamatórios *in vivo* da Q3G utilizando camundongos BALB/c desafiados com ovoalbumina. A contagem de eosinófilos do fluido broncoalveolar, do sangue e do parênquima pulmonar foi reduzida nos animais que receberam, através de gavagem, tanto a Q3G como a quercetina; no entanto, a contagem de neutrófilos no sangue e os níveis de interleucina-5 dos homogenatos pulmonares foram reduzidos apenas nos animais que receberam a Q3G.

Investigando os efeitos anti-inflamatórios de *Argemone platyceras*, planta amplamente empregada no México no combate à tosse, à bronquite e à pneumonia, Fernandez *et al.* (2005) identificaram a Q3G e a rutina como os principais compostos presentes nos extratos desse vegetal. Através do tratamento de cobaias com os extratos e suas frações, os autores relataram que a Q3G foi capaz de abolir a resposta à ovoalbumina, utilizada como antígeno, e de diminuir a resposta contrátil ao leucotrieno D4 nas células das vias aéreas, indicando a potencial aplicação desse flavonoide no tratamento da asma.

Estudos apontam que a alta atividade antioxidante exercida pela Q3G desempenha papel importante na proteção das células contra o dano oxidativo. Soundararajan *et al.* (2008) relataram que essa atividade citoprotetora resulta da indução exercida pela Q3G sobre a expressão de genes associados à biossíntese de lipídeos e de colesterol, resultando na manutenção da integridade da membrana celular na presença de

estresse oxidativo. No entanto, investigações *in vitro* a respeito do mecanismo protetor da quercetina e seus derivados sobre danos oxidativos em células C6 de glioma murino mostraram que a quercetina, mas não a rutina e a Q3G, foi efetiva como protetor celular (Chen *et al.*, 2006).

Yang & Liu (2009) estudaram os efeitos antiproliferativos do extrato de maçã e da Q3G em culturas de células de câncer de mama (MCF-7). A combinação do extrato de maçã com a Q3G reduziu os valores de EC_{50} (50% da concentração efetiva máxima) em 2 e 4 vezes, respectivamente, quando comparados aos valores para somente o extrato de maçã e somente a Q3G, indicando um possível efeito sinérgico entre essas substâncias.

Diversos autores têm relatado os efeitos hipoglicêmicos da Q3G. Gasparotto Jr. *et al.* (2011), estudando os efeitos de extratos de *Tropaeolum majus*, um vegetal comumente utilizado como diurético, em ratos hipertensos, atribuíram esse efeito à Q3G, composto presente em abundância nesses extratos. Muitos vegetais tradicionalmente empregados por seus efeitos hipoglicêmicos apresentam a Q3G em sua composição, tais como *Equisetum* sp. (Winkelman, 1986, 1989), *Acacia nilotica* (Ali *et al.*, 2012), amora (*Morus* sp.) (Kumar & Chauhan, 2008), jamelão (*Syzygium cumini*) (Ruan *et al.*, 2008; Jagetia & Baliga, 2002) e cebola (*Allium cepa*) (El-Demerdash *et al.*, 2005; Kim & Kim, 2006; Azuma *et al.*, 2007).

A Q3G enzimaticamente modificada (EMIQ), também chamada de α -glicosil isoquercitrina, é produzida pela glicosilação da Q3G com ciclodextrina-glicanotransferase, e possui efeito preventivo na fotodegradação de flavorizantes, vitaminas e corantes naturais e sintéticos. No Japão, a EMIQ foi aprovada como aditivo para alimentos (Shimada *et al.*, 2010), e os EUA declararam esse composto como “*Generally Regarded as Safe*” (GRAS) para uso em diversos alimentos (Salem *et al.*, 2010). Nos EUA e em outros países que adotam a classificação GRAS, a EMIQ é usada em bebidas não alcoólicas, *coolers* com vinho, gomas de mascar, laticínios congelados ou aromatizados, gelatinas e pudins, geleias, balas de goma, bolos, biscoitos e massas.

A escassez de fontes naturais de Q3G e sua baixa concentração em alimentos fazem com que os processos para isolamento desse composto a partir de matrizes naturais apresentam pouca eficácia. Em contraste, a ampla distribuição e a abundância da rutina entre espécies vegetais do mundo inteiro fazem deste flavonoide uma matéria-

prima adequada para a obtenção de Q3G, através da hidrólise de seu resíduo ramnosídico (Takahama *et al.*, 2009).

2.5. Hidrólise de flavonoides

A biodisponibilidade limitada de muitos flavonoides constitui um obstáculo importante para suas atividades biológicas. Estudos têm demonstrado que a molécula glicosídica é o principal determinante da absorção dos flavonoides da dieta humana, sendo o resíduo ramnosídico absorvido de forma menos eficiente em comparação às formas aglicona e glicosilada (Hollman *et al.*, 1999; Aherne & O'Brien, 2002).

Existem evidências de que os flavonoides agliconas exibem maior atividade antioxidante se comparados às formas glicosiladas, visto que esta atividade depende de um OH livre na posição 3 do anel C da molécula. Este OH livre não está presente nas formas glicosiladas.

Com o objetivo de melhorar as propriedades benéficas dos flavonoides, vários estudos têm relatado a modificação destas moléculas através de reações químicas ou enzimáticas de hidrólise, também conhecidas como reações de desglicosilação.

2.5.1. Processos de hidrólise química de flavonoides

O método químico de hidrólise de flavonoides pode ser realizado em meio alcalino ou ácido. Ambas as técnicas são empregadas na remoção de resíduos glicosídicos de flavonoides para a obtenção de glicosídeos secundários e flavonoides agliconas, em especial para a extração dos flavonoides de matrizes alimentares (Takahama *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011; Madhujith & Shahidi, 2009).

Algumas ligações glicosídicas de flavonoides são facilmente hidrolisadas pelo método de hidrólise ácida; no entanto, outras ligações são lentamente hidrolisadas (Garegg, 2004). Formas agliconas são geralmente obtidas através de hidrólise empregando HCl, devido à forte propriedade catalítica de hidrólise da ligação β -D-glicosídica apresentada por esse ácido (Wang *et al.*, 2011).

A hidrólise em meio ácido foi empregada por Hertog *et al.* (1992) na elaboração de um protocolo amplamente utilizado para análise do conteúdo de flavonóis e flavonas de fontes vegetais. As formas agliconas produzidas através de hidrólise ácida de amostras de matrizes vegetais podem ser prontamente analisadas por cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE) em fase reversa. Entretanto, alguns autores afirmam que as condições de hidrólise que resultam em uma ótima taxa de extração e hidrólise de um determinado flavonoide presente na matriz vegetal podem ser muito extremas para outros compostos fenólicos presentes na mesma matriz, prejudicando a extração e a quantificação total dos mesmos (Nuutila *et al.*, 2002). Desta forma, Merken *et al.* (2001) procuraram minimizar o problema, determinando as condições ótimas para a extração ácida de flavonoides. Os autores observaram a ocorrência de um padrão comparável a uma cinética de primeira ordem e, extrapolando os dados para o tempo zero, puderam determinar matematicamente as concentrações de flavonoides nas matrizes, ainda que o ácido utilizado na extração e na hidrólise dos flavonoides ocasionasse a perda de alguns deles.

Bylka & Matlawska (2001) relataram a hidrólise química total e parcial de flavonoides extraídos de folhas de uva-de-rato (*Phytolacca americana*), um vegetal herbáceo nativo do leste da América do Norte, utilizando HCl em diferentes concentrações e tempos diferentes de reação. A partir de formas glicosiladas do kaempferol, os autores obtiveram a molécula aglicona após 2 horas de hidrólise com aquecimento catalisada por HCl 2%. A hidrólise parcial foi realizada com emprego de HCl 0,5%, com aquecimento, durante 5 minutos de reação, levando à formação de kaempferol-3-glicosídeo.

2.5.2. Processos de hidrólise enzimática de flavonoides

Reações de biotransformação constituem em alterações químicas na estrutura da molécula, catalisadas por enzimas, formando em geral produtos com propriedades químicas, físicas e/ou biológicas diferentes do composto original. A biotransformação tem se mostrado uma alternativa promissora para a busca de novos compostos potencialmente ativos, derivados de substâncias conhecidas e ativas biologicamente.

As reações enzimáticas apresentam vantagens em relação aos métodos químicos, principalmente no que diz respeito à seletividade e às condições brandas de reação (Wang *et al.*, 2011), à sua grande disponibilidade, seu baixo custo e a eficiência das reações, gerando poucos subprodutos. A hidrólise enzimática de flavonoides tem sido apontada como uma alternativa vantajosa para o aumento de sua biodisponibilidade e a melhora de suas funções fisiológicas.

Estudos demonstram que a hidrólise enzimática de grupos glicosil específicos ou a conversão de flavonoides glicosilados a agliconas aumentam a atividade antiinflamatória

da naringina (Amaro *et al.*, 2009) e a atividade antioxidante do kaempferol (Park *et al.*, 2006a), além de aumentar a biodisponibilidade da hesperidina (Nielsen *et al.*, 2006) e de outros flavonoides glicosilados presentes em sucos de frutas e no chá verde (González-Barrio *et al.*, 2004).

A associação de diferentes enzimas tem se mostrado útil na modificação de flavonoides complexos presentes em frutas, legumes e bebidas. As enzimas β -galactosidase e hesperidinase foram eficientemente usadas na hidrólise dos glicosídeos de kaempferol (kaempferol-3-O-[2-O- β -D-galactopiranosil-6-O- α -L-ramnopiranosil]- β -D-glicopiranosose e kaempferol -3-O-[2-O- β -D-xilopiranosil-6-O- α -L- ramnopiranosil]- β -D-glicopiranosose) presentes no chá verde, gerando 95% da aglicona kaempferol pura. O kaempferol foi mais eficiente como antioxidante utilizando o modelo para avaliação da atividade com DPPH e efeito inibitório da XO (Park *et al.*, 2006a). Além disto, o kaempferol aglicona também se mostrou eficaz na inibição da 5- α -redutase, enzima responsável pela conversão da testosterona a dihidrotestosterona, composto responsável por alguns efeitos adversos, como alopecia, acne e câncer de próstata (Park *et al.*, 2006b).

A Tabela 4 sintetiza alguns estudos envolvendo processos de bioconversão de polifenóis para a obtenção de derivados funcionais. De modo geral, as reações enzimáticas de hidrólise de flavonoides constituem em ferramentas eficientes para a síntese de compostos com maior atividade antioxidante e maior biodisponibilidade em relação às moléculas originais, através da remoção total ou parcial dos glicosídeos presentes nas mesmas.

Os processos de hidrólise enzimática podem ser aplicados tanto a flavonoides isolados quanto a matrizes alimentares contendo diversas classes desses compostos, que podem estar presentes na forma glicosilada com diversos açúcares, como glicose e/ou ramnose, entre outros.

A especificidade da enzima utilizada é um dos principais fatores determinantes do tipo de produto de hidrólise formado, quanto à natureza de sua glicosilação. Associações de duas ou mais enzimas também foram empregadas com o objetivo de otimizar a síntese de derivados desglicosilados de flavonoides (Sun *et al.*, 2005; Silva, 2011).

Tabela 4. Processos enzimáticos de bioconversão de polifenóis isolados e presentes na matriz alimentar para obtenção de derivados funcionais

SUBSTRATO	ENZIMA	ATUAÇÃO	RESULTADO	REFERÊNCIA
Farinha de soja desengordurada	β -glicosidase	Hidrólise de isoflavonas, como a genistina (glicosil-isoflavona) e obtenção da aglicona genisteína	Aumento da capacidade antioxidante avaliada <i>in vitro</i>	Park <i>et al.</i> , 2001
Sucos de frutas (laranja e groselha) e chá verde	α -L-ramnosidases	Hidrólise da antocianina (suco de groselha), flavanonas (suco de laranja) e flavonóis (chá verde)	Atuação das enzimas na hidrólise da fração ramnose dos flavonoides. Não foi avaliada atividade antioxidante	González-Barrio <i>et al.</i> , 2004
Suco de laranja	Hesperidinase	Hidrólise da fração glicosídica (ramnose) da hesperidina presente no suco de laranja	Aumento da biodisponibilidade da hesperidina avaliada pela concentração plasmática de hesperitina em voluntários	Nielsen <i>et al.</i> , 2006
Extrato de chá verde e padrão de EGCG	Tanase	Hidrólise do composto EGCG em EGC e ácido gálico	Aumento da capacidade antioxidante avaliada <i>in vitro</i>	Battestin <i>et al.</i> , 2008
Suco de aspargo	Enzimas pectinolíticas com atividade de rutinase	Hidrólise da fração glicosídica (ramnose) da rutina e obtenção da aglicona quercetina	Não foi observado aumento da capacidade antioxidante avaliada <i>in vitro</i>	Sun <i>et al.</i> , 2005
Extratos de chá verde e mate, padrões de EGCG e ácido clorogênico	Tanase	Hidrólise da EGCG em EGC e ácido gálico e do ácido clorogênico em ácido cafeico e quínico	Aumento da capacidade antioxidante avaliada <i>in vitro</i>	Macedo <i>et al.</i> , 2011
Extrato de erva-mate e padrão de ácido clorogênico	Clorogenato esterase	Hidrólise dos ésteres do extrato e do padrão	Aumento da atividade antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e aumento da concentração plasmática de ácido cafeico dos ratos	Rivelli <i>et al.</i> , 2011
Sucos (laranja e limão) e chás (verde e mate)	Hesperidinase, naringinase, glicosidase e β -galactosidase	Hidrólise da fração glicosídica (glicose e/ou ramnose) da rutina, hesperidina e kaempferol glicosilado	Aumento da capacidade antioxidante avaliada <i>in vitro</i>	Silva, 2011

O aumento das concentrações plasmáticas dos derivados obtidos por hidrólise de polifenóis, como relatado por Nielsen *et al.* (2006) e Rivelli *et al.* (2011), indica que a absorção e a biodisponibilidade desses compostos são altamente influenciadas pelo tipo e grau de glicosilação. Embora investigações a respeito da atividade antioxidante *in vivo* de polifenóis biotransformados não sejam abundantes, o estudo conduzido por Rivelli *et al.* (2011) fornece evidências de que o aumento da atividade antioxidante *in vitro* que frequentemente ocorre após a hidrólise enzimática dos polifenóis se reflete na atividade antioxidante exercida pelos mesmos em sistemas biológicos.

As α -L-ramnosidases [E. C. 3.2.1.40] são glicosil hidrolases que clivam a α -L-ramnose terminal de glicosídeos naturais. Essa classe de enzimas tem ampla distribuição na natureza, sendo produzida por tecidos animais e vegetais, leveduras, fungos e bactérias. Estas enzimas são consideradas de grande importância biotecnológica, devido a suas aplicações no clareamento de sucos cítricos e na redução do amargor dos mesmos, no aprimoramento do aroma de vinhos e na produção de moléculas de interesse farmacêutico, como a prunina, um adoçante utilizado por diabéticos (Yadav *et al.*, 2010).

As principais fontes de α -L-ramnosidases de interesse comercial são os fungos *Penicillium* sp., *Penicillium decumbens* e *Aspergillus niger* (Manzanares *et al.*, 2000; Gallego *et al.*, 2001), além de bactérias do gênero *Bacillus* sp. (Hashimoto *et al.*, 1999).

A maioria das α -L-ramnosidases é ativa em ligações glicosídicas α -1,2, seguida pelo o número de α -L-ramnosidases ativas em ligações α -1,6. Algumas enzimas dessa classe são ativas em ligações α -1,4, sendo raras as que clivam outras ligações glicosídicas.

A cinética e os mecanismos das reações catalisadas por α -L-ramnosidases não são muito conhecidos. Zverlov *et al.* (2000) determinaram o tipo de mecanismo enzimáticos da ramnosidase A (RamA) de *Clostridium stercorarium* através da análise dos produtos de hidrólise do p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosídeo utilizando a técnica de ressonância magnética $^1\text{HMNR}$. O comportamento cinético indicou um mecanismo de hidrólise inverso pelo qual a β -ramnose é formada a partir do α -ramnosídeo via substituição única, mas é espontaneamente convertida à forma α por mutarrotação. A α -L-ramnosidase de *Aspergillus aculeatus* também age por hidrólise invertida.

Manzanares *et al.* (2000) purificaram uma α -L-ramnosidase produzida por uma cultura de *Aspergillus nidulans* desenvolvida em meio contendo L-ramnose como única fonte de carbono. A enzima, com peso molecular de 102 kDa, tem seu pH ótimo entre 4,5

e 6,0 e temperatura ótima de 60°C, e hidrolisa ligações glicosídicas α -1,2 e α -1,6 de β -D-glicosídeos. Entretanto, mais investigações a respeito da cinética e dos mecanismos das reações catalisadas por α -L-ramnosidases são necessários para melhor compreensão do mecanismo molecular de catálise dessas enzimas (Yadav *et al.*, 2010).

A hesperidinase (1,6 α -L-ramnosidase, E.C. 3.2.1.40) é uma α -L-ramnosidase com atividade significativa de β -D- glicosidase que catalisa a hidrólise de resíduos terminais não-redutores de β -D-glicosídeos, com a liberação de glicose. A hesperidinase é produzida principalmente pelo fungo *Aspergillus niger* (Yadav *et al.*, 2010).

Miyake & Youmoto (1999), investigando a atividade catalítica da hesperidinase sobre o substrato hesperidina, verificaram a eficiência da reação em diferentes temperaturas (de 40 a 70°C), reportando a faixa de temperatura ótima para a atividade da enzima entre 50 e 60°C.

Um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo feito em humanos indicou uma melhora significativa na biodisponibilidade do metabólito da hesperidina do suco de laranja após modificação enzimática. O produto hesperitina-7-glicosídeo, gerado após remoção do grupo ramnose desse flavonoide pela hesperidinase, levou a uma concentração plasmática da aglicona (hesperitina) quatro vezes maior em comparação com a bebida não modificada (Nielsen *et al.*, 2006). Em outro trabalho, a ramnosidase de *Aspergillus aculeatus* foi utilizada na modificação do suco de laranja para a remoção do grupo ramnosídico terminal das flavanonas encontradas na bebida, levando à melhora da biodisponibilidade desses compostos (González-Barrio *et al.*, 2004).

A Figura 5 ilustra a atuação da hesperidinase sobre a rutina, que leva à obtenção de Q3G e quercetina, em proporções variadas, dependendo das condições da reação. Para a obtenção de Q3G, a atividade de β -D-glicosidase da enzima deve ser minimizada, já que leva à hidrólise da glicose da molécula, originando sua forma aglicona, a quercetina. Métodos de purificação da fração α -L-ramnosidase da hesperidinase para obtenção de monoglicosídeos, como a Q3G, são custosos e trabalhosos. Sendo assim, uma alternativa viável é a inativação da fração β -D-glicosidase da enzima através de tratamento térmico seletivo, que permite ao mesmo tempo a manutenção da atividade de α -L-ramnosidase da mesma (Vila-Real *et al.*, 2011).

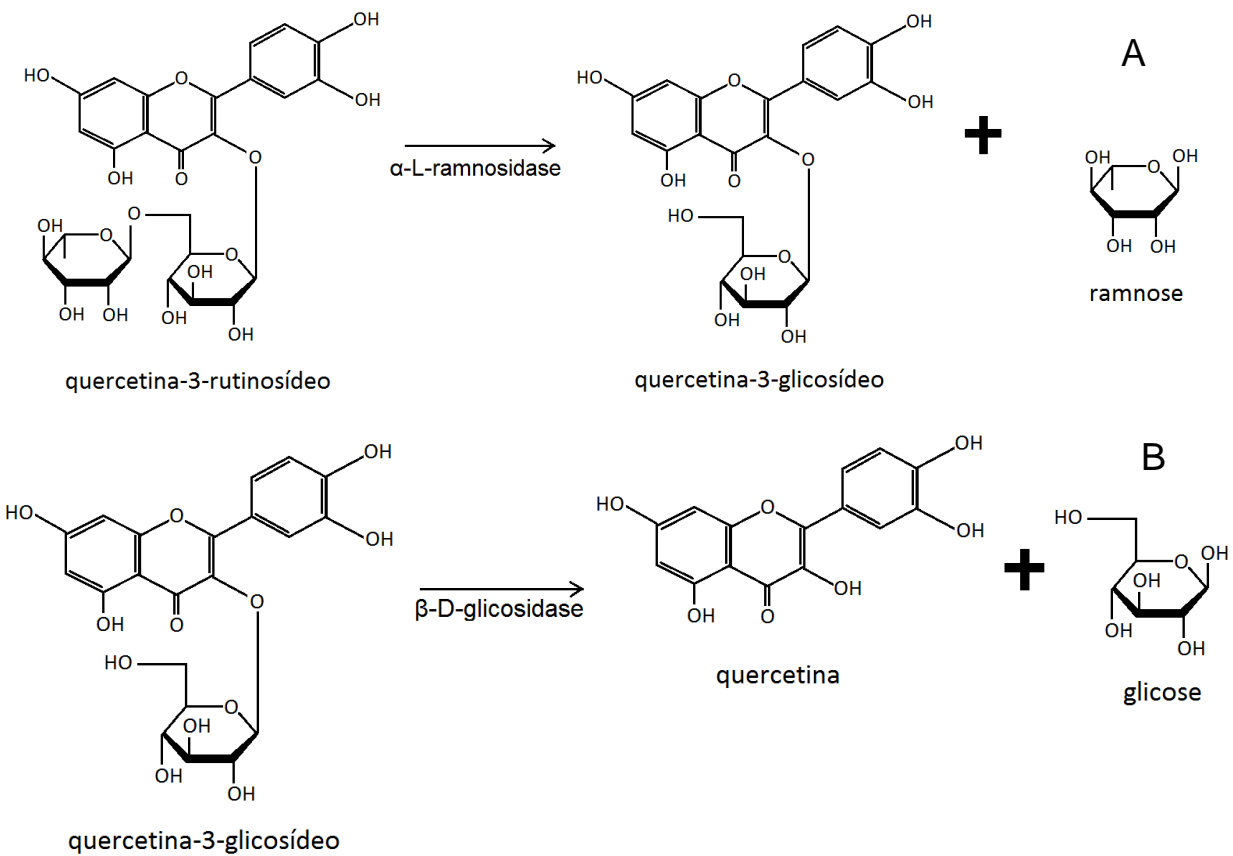


Figura 5. Ação da hesperidina sobre a rutina e a quercetina-3-glicosídeo. (A) atividade de $\alpha\text{-L-ramnosidase}$. (B) atividade de $\beta\text{-D-glicosidase}$

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar comparativamente as atividades antioxidante e antiproliferativa da rutina antes e após hidrólise enzimática catalisada pela hesperidinase de *Penicillium* sp. em condições de reação previamente estabelecidas para aumentar a eficiência da conversão de rutina em quercetina 3-glicosídeo (Q3G).

3.2. Objetivos específicos

1. Comparar a cinética de hidrólise química em meio ácido e de hidrólise enzimática em relação à eficiência na conversão de rutina em Q3G;

2. Estabelecer um processo enzimático eficiente para hidrólise parcial da rutina, com a retirada da molécula de ramnose, utilizando hesperidinase de *Penicillium* sp.;

3. Estudar a cinética de inativação térmica da fração β -D-glicosidase da hesperidinase de *Penicillium* sp., mantendo a atividade de α -L-ramnosidase desta enzima, para aumentar a síntese de Q3G através de hidrólise enzimática parcial da rutina;

4. Avaliar a atividade antioxidante da rutina antes e após hidrólise enzimática utilizando os métodos *in vitro* de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH), descoramento do β -caroteno e inibição da enzima xantina oxidase (XO);

5. Avaliar a atividade antiproliferativa da rutina antes e após hidrólise enzimática com o emprego de painel de células tumorais humanas, utilizando o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular;

6. Comparar a bioatividade da Q3G, principal produto da hidrólise da rutina, com os dados obtidos para a quercetina padrão, um conhecido flavonoide de atividade antioxidante e antiproliferativa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Enzimas, padrões e reagentes

As reações enzimáticas foram realizadas utilizando hesperidina de *Penicillium* sp. comercializada pela Sigma-Aldrich Chemical Co. (nº catálogo H8137). Também foram adquiridos do mesmo fornecedor a enzima xantina oxidase de leite bovino (0,4 - 1,0 unidades/mg proteína, nº catálogo X4376) e os padrões de rutina ($\geq 94\%$, nº catálogo R5143), quercetina-3-glicosídeo (isoquercitrina) ($\geq 90\%$, nº catálogo 17793) e quercetina ($\geq 95\%$, nº catálogo 337951) para a confecção das curvas padrão. Foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co., Brasil os substratos sintéticos usados para determinar a atividade da enzima, p-nitrofenil α -L-ramnopiranosídeo ($\approx 99\%$, nº catálogo N3513) e p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo ($\geq 98\%$, nº catálogo N7006), e os reagentes para os testes de determinação da atividade antioxidante, β -caroteno ($\geq 95\%$, nº catálogo C4582), ácido linoleico ($\geq 93\%$, nº catálogo L1268) e o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazila) (nº catálogo D9132). Os ácidos, bases e sais utilizados foram de marca Merck e todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Cultura de células

As linhagens celulares cedidas pelo NCI (National Cancer Institute, EUA) ao CPQBA/Unicamp utilizadas no trabalho foram: U251 (glioma), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-ADR/RES (ovário, linhagem com resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (adenocarcinoma renal), NCI-H460 (adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário), HT-29 (adenocarcinoma de cólon) e K562 (leucemia mieloide crônica). Estas linhagens foram cultivadas em frascos de 25 cm³ com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência, as linhagens eram repicadas, o que ocorreu em média uma vez por semana.

Para linhagens aderidas (todas as linhagens utilizadas, com exceção da K562), o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para isso, o

meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 μ L de tampão de Hank's (Sigma) para eliminar resíduos de meio de cultura e após aspiração do tampão, foram adicionados 500 μ L de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell) a 37°C até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

4.2.1. Descongelamento das células

O descongelamento das células foi realizado sempre que o painel celular em uso atingia a passagem 17. O descongelamento dos criotubos foi realizado à temperatura ambiente, o conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e, para lavagem do glicerol utilizado no congelamento, o volume foi completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640 contendo 5% SFB. O tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado de células foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultura. A suspensão foi transferida para frascos de manutenção de T25 e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

4.2.2. Congelamento das células

Para sua expansão, as células foram cultivadas em frascos de 75 cm² (T75) e o volume final de suspensão celular a ser congelado foi sempre de 1x10⁶ cel/mL. Para células aderidas, após tripsinização com tripsina/EDTA (Sigma), as células foram ressuspendidas em 10 mL de meio suplementado com 30% de SFB, e em seguida foi realizada a contagem do número de células em câmara de Neubauer. A solução celular foi centrifugada a 2000 rpm, a 4°C, por 4 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, a seguir, foi adicionado meio RPMI com 30% de SFB e 20% de glicerol em volume calculado para obtenção de uma concentração final de 1x10⁶ cel/mL. Cada criotubo contendo 1 mL da solução celular foi colocado na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 horas, para depois ser imerso na fase líquida.

4.3. Determinação da atividade enzimática da hesperidinase

A atividade de α -L-ramnosidase da hesperidinase foi avaliada utilizando 0,20 mM do substrato sintético p -nitrofenil α -L-ramnopiranosídeo em tampão citrato 20 mM (pH 4,0). A atividade de β -D-glicosidase da hesperidinase foi determinada usando 0,20 mM de p -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo em tampão citrato 20 mM (pH 4,0). A concentração de enzima utilizada foi de 50 mg/L e as reações foram realizadas em shaker (Tecnal, modelo TE-421) com agitação de 100 rpm na temperatura de 40°C por 30 minutos. As análises foram realizadas em triplicata e expressas como média e desvio padrão das determinações. A concentração de p -nitrofenol livre produzido após a hidrólise foi avaliada em espectrofotômetro UV/VIS (Jenway 6105) em um comprimento de onda (λ) de 410 nm usando uma curva padrão construída com 0 - 2 μ moles de p -nitrofenolato a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ mol/mL (Figura 6). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ mol de p -nitrofenol livre por minuto nas condições de reação descritas (U/min).

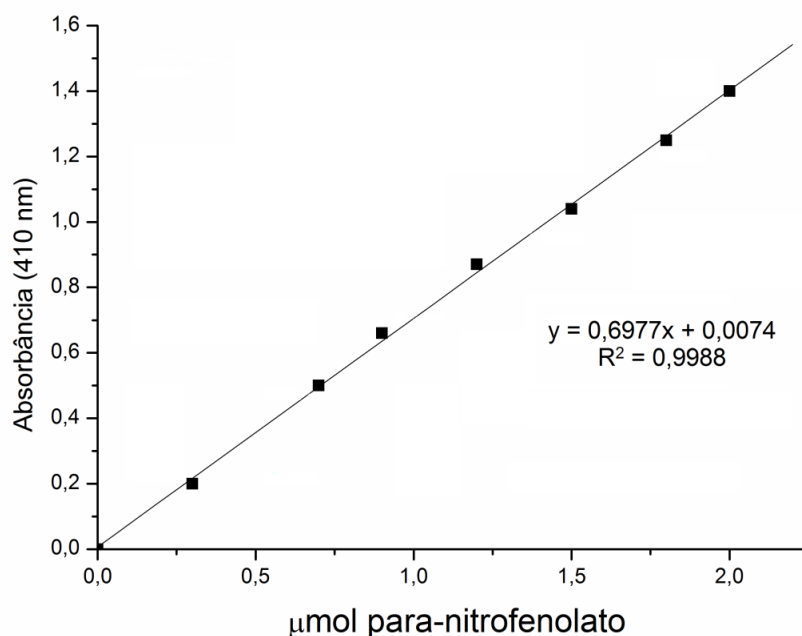


Figura 6. Curva padrão de p -nitrofenolato a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ mol/mL

4.4. Cinética de inativação da β -D-glicosidase

Para estudar a cinética de inativação enzimática, as suspensões das enzimas (50 mg/L) em 5mL de tampão citrato 20 mM (pH 4,0) foram colocadas em shaker (Tecnal, modelo TE-421) com agitação de 100 rpm, por 30 minutos, nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80°C. As reações foram interrompidas por imersão dos frascos em banho de gelo por 5 minutos. Após o tratamento térmico, as enzimas foram utilizadas para determinação da atividade enzimática de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase, conforme descrito no item 4.3. O controle continha uma amostra de enzima não submetida à inativação térmica.

As atividades foram expressas em unidade de atividade enzimática (U) por minuto de reação. Para descrever a cinética de inativação para as atividades de β -D-glicosidase e de α -L-ramnosidase foi também utilizada a razão entre as atividades de α -L-ramnosidase e β -D-glicosidase (Ram/Gli).

4.5. Reação de hidrólise enzimática da rutina

A solução de hesperidinase (50 mg/L) em tampão citrato 20 mM (pH 4,0) previamente submetida ao tratamento térmico a 70°C por 30 minutos para inativação seletiva da atividade de β -D-glicosidase, conforme descrito no item 4.5, foi diluída a 20 mg/L utilizando tampão acetato 0,05 M (pH 4,0) e utilizada para a determinação da cinética de hidrólise da rutina.

Para o preparo da mistura de reação, 1 ml de solução de rutina (1% p/v em metanol) foi adicionado a 3 mL de tampão acetato 0,05 M (pH 4,0) e a mistura submetida a agitação magnética (marca Fisatom modelo 753A) por 1 minuto. Em seguida foram acrescentados 100 μ L da preparação enzimática na concentração de 20 mg/L), e a mistura agitada e incubada a 40°C por 2, 4, 8 e 12 horas com agitação de 130 rpm em shaker (Tecnal, modelo TE-421). A reação foi interrompida pela desnaturação da enzima promovida através de fervura (100°C) por 30 minutos, e as amostras levadas diretamente para a liofilização e armazenadas a -80°C. Os ensaios foram realizados em triplicata. As soluções de rutina incubadas sob as mesmas condições sem adição de enzima e com a enzima sem o tratamento térmico foram utilizadas como controle da reação.

4.6. Reação de hidrólise ácida da rutina

Em erlenmeyers, 1 mL da solução de rutina (1% p/v em metanol) foi incubado com 20 mL de solução de HCl 1 M em banho fervente a 100°C por 30 minutos, 1 e 2 horas. Após este período as amostras foram levadas diretamente para a secagem por liofilização e armazenadas a -80°C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os produtos posteriormente submetidos à análise por CLAE-EM.

4.7. Métodos analíticos

4.7.1. Quantificação dos derivados de flavonoides por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CLAE - EM)

A técnica de CLAE aliada à alta seletividade e desempenho da EM tem sido amplamente empregada nos últimos anos por permitir a rápida separação dos analitos, levando a tempos de análise menores e resultados mais precisos quando comparados aos métodos tradicionais de cromatografia líquida.

Após as reações de hidrólise química e enzimática, os produtos de hidrólise foram dissolvidos em metanol, filtrados em filtros de seringa de 0,45 µm e analisados por CLAE - EM.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando um sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) equipado com uma coluna Waters UPLC BEH (2,1 x 50 mm, tamanho de partícula 1,7 µm) em temperatura de 30°C. Foram injetados 3 µL de cada amostra, aplicando-se um gradiente utilizando 2 fases móveis – (A) água ultrapurificada com 1% de ácido fórmico e (B) metanol (Tedia, Brasil), iniciando-se com 5% de B, atingindo 100% de B em 8 minutos, mantido até 8,50 minutos e finalmente retornando às condições iniciais e estabilizando em 10 minutos. A detecção foi realizada no modo de íons negativo utilizando um espectrômetro de massas Acquity TQD com fonte ESI (*“Electrospray Ionization”* - ionização por spray de elétrons) (Micromass Waters, Milford, MA, USA) sob as seguintes condições: capilar - 3000 V, cone - 30 volts, temperatura da fonte de 150°C, e temperatura de dessolvatação de 350°C. A quantificação dos

compostos da hidrólise foi realizada com o auxílio de curvas-padrão determinadas através da injeção de padrões dos flavonoides de interesse (rutina, quercetina e Q3G) em concentrações entre 30 e 300 µg/mL.

4.7.2. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

4.7.2.1. Método de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH)

Segundo Faria *et al.* (2005), esse método é baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de coloração violeta. Quando ocorre a adição de uma substância antioxidante ao meio, capaz de ceder um átomo de hidrogênio neutralizando esse radical livre, ocorre o decréscimo da absorbância a 517 nm. Uma solução metanólica de DPPH de concentração 0,02 mg/L (750 µL) foi acrescentada a 120 µL de solução das amostras de flavonoides antes e após hidrólise, preparadas em tampão acetato 0,3 M pH 3,8 (0,75 mg do composto/mL) ou, no caso do controle, a 120 µL de metanol. As misturas foram incubadas a 25°C por 25 minutos e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV/VIS (marca Jenway 6105) a 517 nm. Uma solução de rutina em tampão acetato 0,3 M pH 3,8 (0,75 mg/mL) foi utilizada para calibrar o equipamento. A capacidade de sequestro do radical DPPH foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Sequestro de radicais DPPH (\%)} = \frac{(Absc - Absam)}{Absc} \times 100,$$

onde *Absc* e *Absam* são os valores de absorbância do controle e das amostras teste, respectivamente. As determinações foram realizadas em triplicata e os testes realizados também para o padrão de quercetina.

4.7.2.2. Método do descoramento do β-caroteno

A capacidade da rutina e de seus produtos de hidrólise em inibir a peroxidação lipídica foi determinada através de um sistema β-caroteno – ácido linoleico, de acordo com o método de Miller (1971) com adaptações. Uma mistura contendo 50 µL de β-

caroteno (2 mg/mL em clorofórmio), 40 µL de ácido linoleico, 1 mL de clorofórmio e 400 mg de Tween 40 foi preparada. O clorofórmio foi removido sob atmosfera de nitrogênio, 50 mL de água destilada saturada com oxigênio foram acrescentados e a mistura foi submetida a agitação vigorosa (agitador Fisatom modelo 753A). Em tubos de vidro com tampa de rosca, 225 µL da solução de β-caroteno foram acrescentados a 100 µL das amostras em tampão acetato 0,3 M, pH 3,8 (0,75 mg do composto/mL) ou a 100 µL de metanol para o branco. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro UV/VIS (Jenway 6105) a 470 nm no tempo 0 (imediatamente após a adição das amostras à solução de β-caroteno) e após 120 minutos de incubação a 45°C (para indução da oxidação térmica). A extensão da inibição da absorvância está diretamente relacionada à concentração de antioxidantes. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = [1 - (Abs_0 - Abs_1) / (Abs'_0 - Abs'_1)] \times 100,$$

onde Abs_0 é a absorvância da amostra no tempo zero, Abs_1 é a absorvância da amostra após a incubação (120 minutos) a 45°C, Abs'_0 é a absorvância do controle no tempo zero e Abs'_1 é a absorvância do controle após a incubação (120 min) a 45°C. As determinações foram realizadas em triplicata e os testes realizados também para o padrão de quercetina.

4.7.2.3. Inibição da xantina oxidase

A capacidade de inibição da atividade da XO da rutina antes e após reação de hidrólise foi determinada pela mensuração da formação de ácido úrico a partir do substrato xantina. Uma solução de xantina em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (500 µM) foi incubada com 100 µL de etanol e com o mesmo volume das amostras teste (90 µM preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4). As amostras foram pré-incubados a 37°C por 10 minutos. A solução de XO (0,3 mL a 0,1 U/mL) foi acrescentada à mistura de reação e os frascos incubados a 37°C por 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µL de HCl 3,2%. A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro UV/VIS (Jenway 6105) a 290 nm. O tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foi utilizado como branco e o controle foi composto de uma solução contendo xantina e xantina oxidase. A inibição da XO (XOI) foi calculada como segue:

$$XOI (\%) = \left(1 - \frac{Absam}{Absc} \right) \times 100$$

onde *Absc* e *Absam* são os valores de absorbância para a reação controle e para as amostras teste, respectivamente. As determinações foram realizadas em triplicata e os testes realizados também para o padrão de quercetina.

4.7.2.4. Análise estatística dos dados da capacidade antioxidante

Os dados dos experimentos foram expressos como médias \pm desvio padrão. A significância estatística dos resultados foi acessada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças identificadas foram analisadas através de teste t de Student não pareado, utilizando o software estatístico SPSS (IBM®). Probabilidades associadas (p-valor) de menos de 5% foram consideradas significativas.

4.7.3. Atividade antiproliferativa - avaliação em painel de células tumorais humanas

Os testes em cultura de células foram realizados com o auxílio do grupo de pesquisa do Dr. João Ernesto de Carvalho, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp.

A atividade antiproliferativa em células tumorais humanas foi avaliada utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB) para avaliação do crescimento celular (Monks *et al.*, 1991). Este método permite inferir a porcentagem de crescimento celular através da leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com SRB, um corante aniônico de coloração rosa brilhante que se liga às terminações básicas de aminoácidos proteicos de células vivas previamente fixadas, sendo assim independente do metabolismo celular e permitindo a quantificação de proteínas de modo linear com o número de células da cultura. O ensaio de SRB é relativamente rápido, simples e apresenta alta sensibilidade mesmo em baixas concentrações celulares (1000 – 2500 células por compartimento) (Skehan *et al.*, 1990).

Para determinação da atividade antiproliferativa da rutina antes e após a hidrólise enzimática catalisada pela hesperidina, foram empregadas diversas linhagens de

células tumorais humanas, conforme descrito na Tabela 5. Para comparação os ensaios também foram realizados com a quercetina padrão.

Foram inoculados 100µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos, de uma suspensão celular em meio RPMI/SFB acrescido de 50µg/mL de gentamicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100µL/compartimento das amostras de flavonoides e seus derivados, diluídos em DMSO e dispersos em meio RPMI/5% SFB, em concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), de acordo com o esquema representado na Figura 7.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina (Eurofarma, Brasil), nas concentrações de 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/mL. Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T₀, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras. Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada. Depois de secas à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v) dissolvido em ácido acético 1% e mantidas por 60 minutos a 4°C; em seguida, foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base 10µM (pH 10,5).

A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS a 540nm, em leitor de microplacas, para cada avaliação no tempo zero (T₀; início da incubação) e 48 horas após a incubação tanto das células-controle (C; não-tratadas) quanto expostas aos compostos-teste (T) nas diversas concentrações analisadas (0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL para as amostras e 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/mL para a doxorrubicina).

Tabela 5. Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária	Densidade de Inoculação (10 ⁴ células/mL)
U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarinoma	Ectoderme	5,0
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K562	Medula óssea; leucemia mieloide crônica	Mesênquima	

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

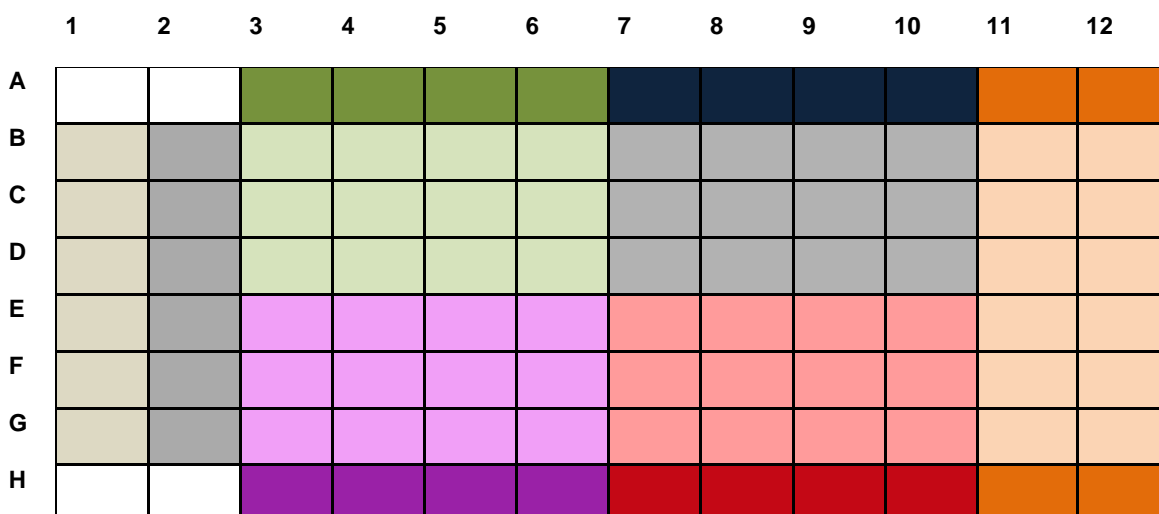


Figura 7. Esquema da aplicação das amostras na placa teste. A primeira coluna cinza representa o controle do meio de cultura (branco do meio). A segunda coluna cinza-escuro representa o controle de células tumorais. As cores claras indicam as substâncias-teste, e as cores escuras representam o controle das substâncias-teste (branco da amostra) nas concentrações testadas

4.7.3.1. Análise estatística dos dados de atividade antiproliferativa

Com os valores médios de absorbância para cada concentração das amostras, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$;

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T_1 = absorbância do branco de células.

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada foram gerados para cada uma das linhagens tumorais. Os valores de GI_{50} (concentração necessária para reduzir em 50% o crescimento celular) foram calculados por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin®, versão 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade enzimática da hesperidinase de *Penicillium sp.*

As atividades de α -L-ramnosidase e de β -D-glicosidase da hesperidinase, as quais hidrolisam ramnose e glicose, respectivamente, foram determinadas utilizando substratos sintéticos, conforme descrito no item 4.3. A Tabela 6 sumariza os resultados das atividades nas condições de reação utilizadas.

Tabela 6. Atividades de α -L-ramnosidase e de β -D-glicosidase da hesperidinase de *Penicillium* sp.

Substrato	Atividade	Valor de atividade enzimática ($\times 10^{-2}$)* em U/min
ρ -nitrofenil α -L-ramnopiranosídeo	α -L-ramnosidase	$3,8 \pm 0,3$
ρ -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo	β -D-glicosidase	$2,3 \pm 0,9$

*A concentração de enzima utilizada foi de 50 mg/L e as reações foram realizadas à temperatura de 40°C por 30 minutos.

5.2. Efeito do tratamento térmico na inativação da β -D-glicosidase da hesperidinase

As estabilidades térmicas de α -L-ramnosidase e de β -D-glicosidase da hesperidinase foram avaliadas a 50, 60, 70 e 80°C por 30 minutos, conforme Figura 8.

A atividade de β -D-glicosidase sofreu um decréscimo maior a 70°C em relação a de α -L-ramnosidase. Apesar de o aquecimento a 70°C por 30 minutos levar a uma diminuição significativa na atividade de α -L-ramnosidase da hesperidinase, se comparado ao aquecimento a 50°C (de $4,2 \times 10^{-2}$ para $2,6 \times 10^{-2}$ U/min), a razão entre as atividades de α -ramnosidase e de β -D-glicosidase (Ram/Gli) foi maior a 70°C (razão de 3,7). Isto mostra que a ramnosidase é mais termoresistente que a glicosidase. Considerando que a atividade de glicosidase foi seletivamente reduzida a 70°C por 30 minutos, a atividade residual de ramnosidase foi utilizada para a produção de Q3G a partir da rutina.

Sendo assim, no presente trabalho, foi possível definir a temperatura de 70°C como a melhor condição para a inativação da β -D-glicosidase da hesperidinase, mantendo a atividade da α -L-ramnosidase.

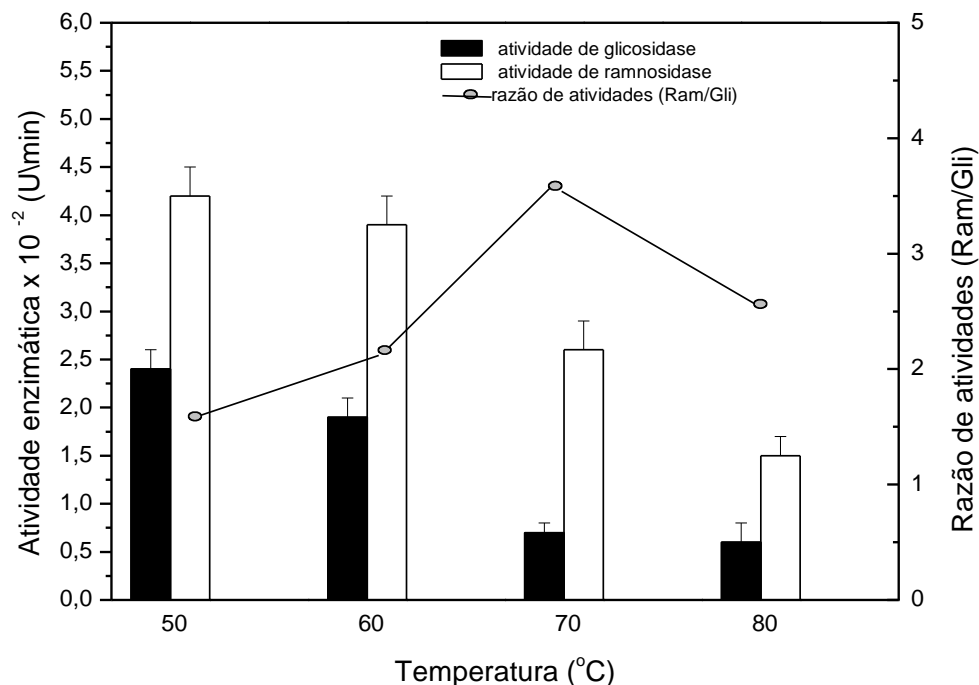


Figura 8. Estabilidades térmicas de α -L-ramnosidase e de β -D-glicosidase da hesperidinase avaliadas a 50, 60, 70 e 80°C por 30 minutos

5.3. Cinética de hidrólise da rutina e análise dos produtos de reação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CLAE - EM)

A rutina foi hidrolisada enzimaticamente utilizando hesperidinase sem tratamento térmico e após tratamento térmico (70°C por 30 minutos), conforme descrito no item 4.5, e também hidrolisada quimicamente em meio ácido (HCl 1M a 30°C por 2 horas), conforme descrito no item 4.6.

Para a análise da cinética de hidrólise química e enzimática da rutina, todos os produtos de hidrólise foram analisados por CLAE-EM. A detecção por EM dos flavonoides quercetina, rutina e Q3G foi realizada no modo de íons negativo. Embora a ionização no modo positivo seja mais comumente empregada para a análise estrutural dos flavonoides, a ionização no modo negativo é referida como mais sensível para essa classe de compostos (De Rijke *et al.*, 2003; Cuyckens *et al.*, 2002; Fabre *et al.*, 2001). A

identificação dos compostos por EM foi realizada através de comparações dos espectros das amostras com espectros de padrões comerciais e por comparação de dados na literatura (Tavares *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012; Krasteva & Nikolov, 2008). A Q3G foi detectada como um pico de m/z 463, correspondente ao íon desprotonado $[M - H]^-$, de acordo com o padrão de Q3G ($M - H]^- = 463$). As fragmentações observadas para as amostras são típicas de unidades de açúcar, sempre com perdas neutras características de hexoses, como mostrado nos espectros característicos dos íons de m/z 301 (quercetina) e 463 (Q3G). Comparando o íon de m/z 463 ao íon de m/z 609 (correspondente à rutina), pode-se observar que a diferença entre os valores de m/z das mesmas é equivalente ao valor de m/z de uma molécula de ramnose (146). Da mesma forma, comparando o íon de m/z 463 ao íon de m/z 301, percebe-se que a diferença entre os valores de m/z equivale ao valor para uma molécula de glicose (m/z 162).

A cinética de hidrólise química da rutina utilizando HCL 1 M, representada pela formação, em função do tempo, dos produtos identificados na reação, pode ser vista na Figura 9. A quantificação dos produtos da hidrólise ácida da rutina mostrou que o processo utilizado promoveu a hidrólise total dos grupos glicosídicos da rutina, ou seja, ramnose e glicose, levando a formação de 84 % de quercetina e somente 2,9 % de Q3G após 2 horas de reação. Em tempos menores de reação, 30 minutos e 1 hora, as concentrações máximas de Q3G obtidas foram de 7,0% e 5,0% (Figura 9). Embora relatos tenham mostrado que concentrações inferiores de ácido clorídrico ou a utilização dos ácidos fosfórico e sulfúrico podem levar à hidrólise parcial da rutina (Wang *et al.*, 2011), no presente trabalho não foram testados outros ácidos ou concentrações variadas do ácido clorídrico.

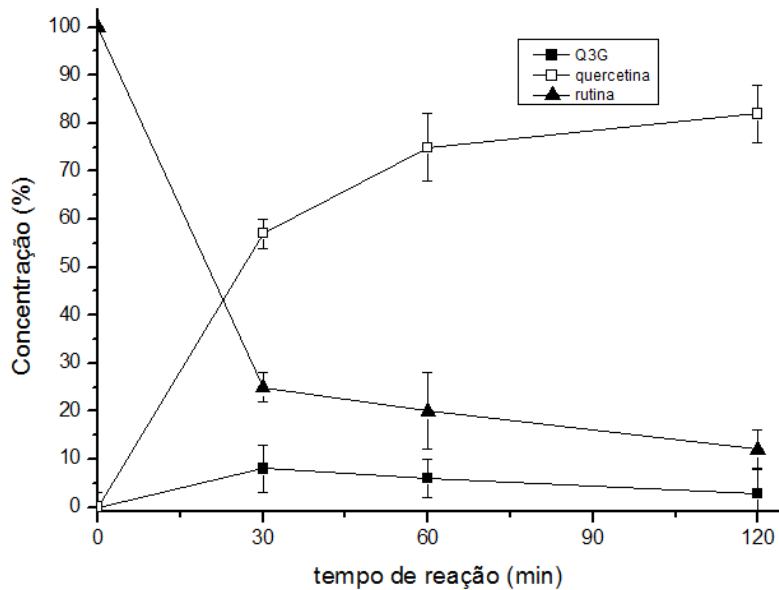


Figura 9. Cinética de hidrólise ácida da rutina. Condições de reação de hidrólise descritas no item 4.6

As cinéticas de hidrólise enzimática, utilizando hesperidinase sem e após tratamento térmico, estão mostradas nas Figuras 10 e 11.

A hidrólise enzimática da rutina com hesperidinase sem tratamento térmico levou à formação de 35% de Q3G e 29% de quercetina após 4 horas de reação (Figura 10).

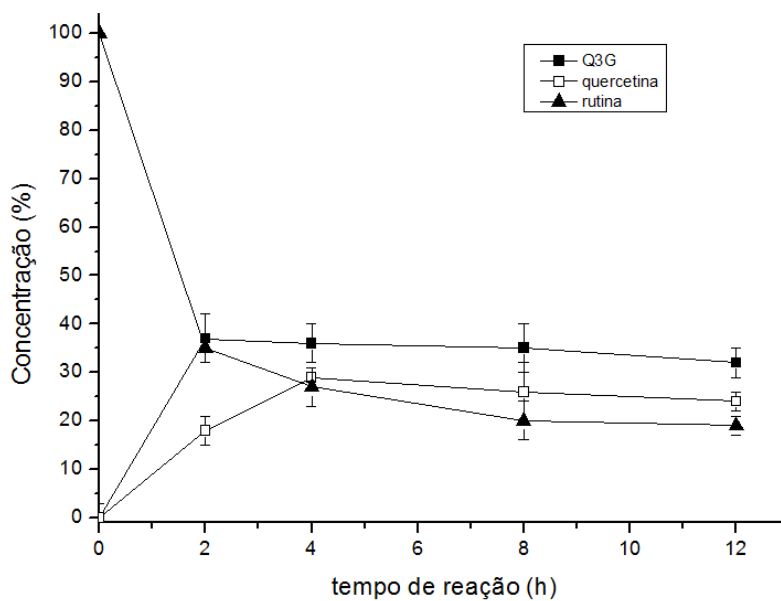


Figura 10. Cinética de hidrólise enzimática da rutina utilizando hesperidinase sem tratamento térmico. Condições de reação de hidrólise descritas no item 4.5

Em contraste, quando a reação de hidrólise da rutina foi catalisada pela hesperidinase submetida a tratamento térmico a 70°C por 30 minutos, 48% da rutina foi convertida em Q3G nas primeiras 2 horas de reação. Em 4 horas de reação, a taxa de conversão aumentou para 69,5% de Q3G, e foram formadas pequenas quantidades da forma aglicona, a quercetina (7,5%) (Figura 11).

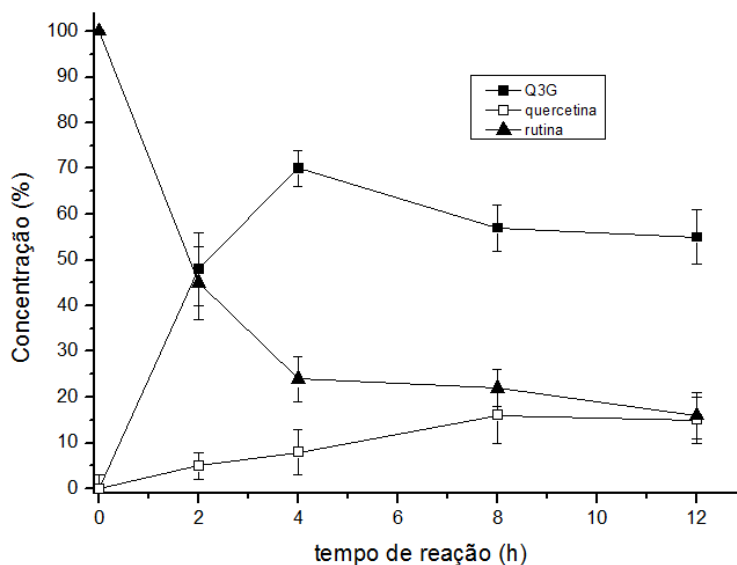


Figura 11. Cinética de hidrólise enzimática da rutina utilizando hesperidinase com tratamento térmico (70°C por 30 minutos). Condições de reação de hidrólise descritas no item 4.5

Tempos de hidrólise enzimática superiores a 4 horas não foram capazes de aumentar a síntese de Q3G. Pelo contrário, ocorreu uma leve diminuição na taxa de Q3G com um aumento da taxa de quercetina aglicona, observado principalmente para o tempo de hidrólise de 8 horas (de 7,5% em 4 horas de reação para 25% em 8 horas de reação, estabilizando-se até o tempo final da reação, 12 horas). Isso indica que tempos de reação entre 4 e 8 horas levam a um aumento nas taxas de hidrólise total, uma vez que a atividade de β -D-glicosidase da hesperidinase foi diminuída com o tratamento térmico, porém não completamente inativada.

Embora o tempo de reação enzimática seja superior ao tempo de reação de hidrólise ácida, grandes concentrações do produto de interesse, a Q3G, puderam ser obtidas somente através de reação enzimática, uma vez que esta reação favorece a hidrólise do grupo ramnose da rutina, permanecendo a glicose esterificada à aglicona

(quercetina). Para que isto ocorra é necessário que a hesperidinase apresente atividade de α -L-ramnosidase superior a atividade de β -D-glicosidase (alta razão Ram/Gli), uma vez que o resíduo de glicose deverá ser mantido para a obtenção de quercetina-3-glicosídeo. Um aumento na razão Ram/Gli foi obtido através do tratamento térmico ao qual a enzima foi submetida.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com investigações previamente descritas na literatura. Wang *et al.* (2011) compararam os métodos químico e enzimático de hidrólise da rutina, relatando a obtenção de quercetina aglicona através de hidrólise ácida a 70°C, por 20 horas, utilizando H₃PO₄ 2,5%, HCl 1% e H₂SO₄ 0,5% (11, 100 e 2,5% de quercetina, respectivamente), enquanto níveis muito inferiores de Q3G foram obtidos (9,60, 0,69 e 1,25%, respectivamente). Já a hidrólise catalisada por uma hesperidinase comercial a 40°C, por 48 horas, permitiu a obtenção de taxas notavelmente maiores de Q3G (43,21%) e 58,1% de quercetina.

Os resultados encontrados no presente estudo para o tratamento térmico da hesperidinase estão de acordo com o que foi recentemente descrito por Gerstorferová *et al.* (2012). Os autores estudaram uma α -L-ramnosidase purificada a partir de culturas de *Aspergillus terreus* desenvolvida em meio rico em L-ramnose. A enzima demonstrou grande estabilidade térmica, operando a 70°C para a produção de Q3G, e alta produtividade de reação (cerca de 300 g/L), com formação de poucas quantidades de quercetina.

A Figura 12 representa os cromatogramas dos produtos da hidrólise enzimática da rutina após 2 e 4 horas de reação com hesperidinase submetida a tratamento térmico (70°C – 30 minutos). Os compostos foram identificados através de seus tempos de retenção (rutina = 4,5 minutos, Q3G = 5,4 minutos e quercetina = 5,8 minutos).

Após 2 horas de reação, os produtos formados compreendem 46% de rutina, 48% de Q3G e 6% de quercetina (Figura 12 A).

Após 4 horas de reação enzimática, os produtos formados são respectivamente: 23% de rutina, 69,5% de Q3G e 7,5% de quercetina (Figura 12 B).

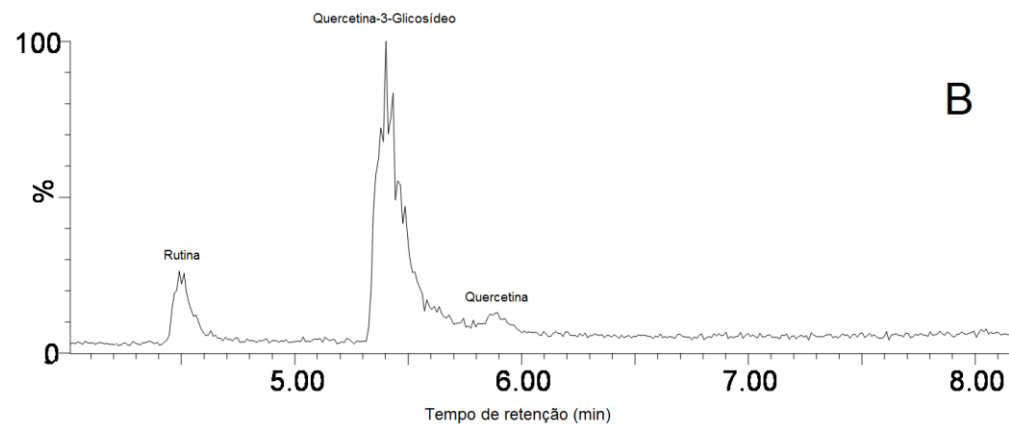
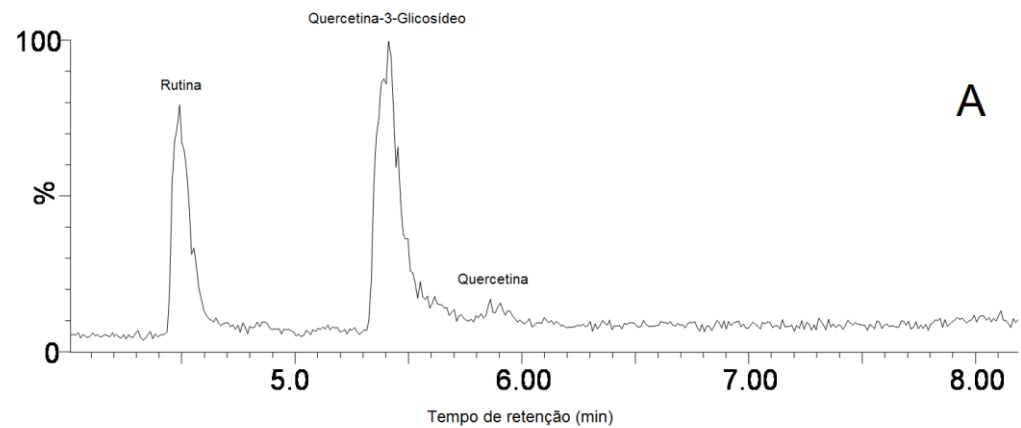


Figura 12. Cromatogramas obtidos por CLAE – EM para as amostras de rutina hidrolisada com hesperidina após 2 horas (A) e 4 horas (B) de reação enzimática. Condições de hidrólise descritas no item 4.5; condições de análise descritas no item 4.7.1

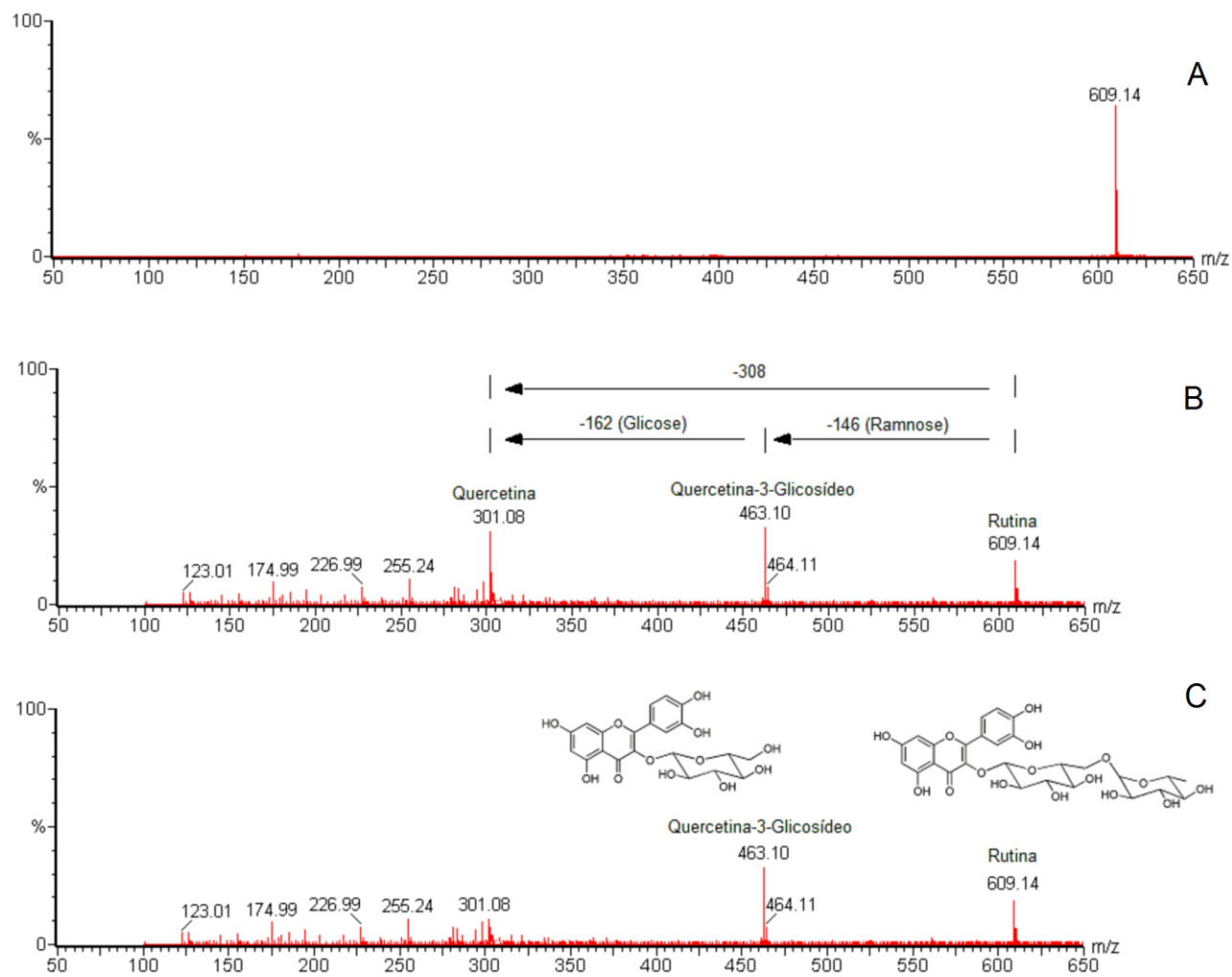


Figura 13. Espectros MS para a rutina padrão (A) e para a rutina hidrolisada com hesperidinae submetida a tratamento térmico (70°C – 30 minutos) (B) e (C). Condições de hidrólise descritas no item 4.5; condições de análise descritas no item 4.7.1

5.4. Influência da hidrólise da rutina na atividade antioxidante

Métodos *in vitro* foram empregados para investigar o poder antioxidante da rutina, da quercetina e da rutina hidrolisada em diferentes tempos de reação (misturas contendo 69,5, 57,1 e 55,2% de Q3G, obtidas respectivamente após 4, 8 e 12 horas de reação com hesperidina submetida a tratamento térmico a 70°C por 30 minutos). Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

O DPPH é um radical de nitrogênio relativamente estável, colorido e comercialmente disponível. Na presença de um antioxidante, ele é reduzido, isto é, o elétron desemparelhado do radical DPPH é pareado, geralmente através da doação de um átomo de hidrogênio pelo antioxidante, fazendo com que a cor da solução mude de roxo para amarelo e permitindo a mensuração da reação em espectrofotômetro através do decréscimo da absorvância (Huang *et al.*, 2005).

Tabela 7. Atividade antioxidante da rutina (controle), da rutina hidrolisada e da quercetina padrão determinada pelos métodos DPPH e β -caroteno

Amostra	Tempo de reação (horas)	Concentração de quercetina-3-glicosídeo (%)	Sequestro de radicais DPPH (%)	β -caroteno (% de inibição da oxidação)
Rutina (controle)		-	62,6 \pm 6,9 ^a	49.4 \pm 2.7 ^a
Rutina hidrolisada	4	69,5 \pm 4,2	81,4 \pm 2,3 ^b	47.1 \pm 7.5 ^a
	8	57,1 \pm 5,4	72,4 \pm 6,6 ^a	50.1 \pm 3.9 ^a
	12	55,2 \pm 6,1	79,3 \pm 1,3 ^b	57.2 \pm 7.9 ^a
Quercetina padrão		-	89,8 \pm 2,5 ^b	78.1 \pm 2.7 ^b

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes em comparação com a rutina antes da bioconversão (controle, $p < 0,05$).

O método DPPH foi utilizado com o objetivo de avaliar a capacidade de doação de hidrogênio da rutina e de seus derivados obtidos por hidrólise, e o poder antioxidante foi expresso como a porcentagem de atividade de sequestro de radicais DPPH em comparação com o controle.

O produto de hidrólise obtido após 4 horas de reação com hesperidinase submetida a tratamento térmico (70°C – 30 minutos), contendo 69,5% de Q3G, apresentou um aumento de aproximadamente 20% na atividade de sequestro de radicais DPPH, em relação à atividade observada para a rutina. A Q3G, o principal produto resultante da hidrólise da rutina pela hesperidinase, apresentou capacidade antioxidante comparável à da quercetina, conhecida por sua potente atividade antioxidante.

Os dados estão de acordo com vários estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados às atividades da quercetina e de seus glicosídeos C(3)-OH e C(4')-OH, que relatam diferenças na eficácia desses compostos. A atividade antirradicais da quercetina e seus derivados se deve provavelmente à presença de um grupamento 1,2-dihidroxibenzeno (catecol) no anel B (Goupy et al., 2003). Entretanto, a glicosilação da quercetina na posição C(4')-OH reduz significativamente a capacidade doadora de hidrogênio do composto (Goupy et al., 2003). O mesmo é observado para os derivados C(3)-OH da quercetina, que mostram potencial reduzido, quando comparados à aglicona livre (Burda & Oleszek, 2001; Materska & Perucka, 2005).

Park *et al.* (2006a) observaram que as formas agliconas ou os flavonoides menos complexos possuem maior atividade antioxidante do que seus derivados glicosilados de maior peso molecular. Estes resultados sugerem que a bioconversão da rutina catalisada pela hesperidinase é uma eficiente ferramenta para o aumento de sua capacidade de neutralização de radicais DPPH.

Ainda na Tabela 7, pode-se observar que o tempo de hidrólise da rutina (4, 8 ou 12 horas) catalisada pela hesperidinase submetida a tratamento térmico (70°C – 30 minutos) não acarretou diferenças significativas na atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH, fato que se torna vantajoso, dado que um alto potencial antioxidante é alcançado com um tempo de reação inferior. Isto pode ser explicado pela concentração de Q3G produzida nos diferentes tempos de reação (Figura 10). Em 4 horas de hidrólise, foi obtida a maior concentração de Q3G (69,5%). Tempos de hidrólise superiores (8 e 12 horas), no entanto, levaram a uma diminuição

da quantidade de Q3G formada. Após 8 horas de hidrólise, a concentração de Q3G obtida foi de 57,1% e, após 12 horas, sofreu ainda um pequeno decréscimo (55,2%).

O método do β -caroteno foi empregado para determinar a capacidade das amostras de inibir a peroxidação do ácido linoleico. A peroxidação do ácido linoleico gera radicais livres que ocasionam o descolorimento do β -caroteno. Desta forma, a presença de antioxidantes na amostra inibe o descolorimento da solução e, conseqüentemente, inibe o decréscimo da absorbância, medida a 470 nm.

A capacidade da rutina hidrolisada pela hesperidinase (em 4, 8 e 12 horas de hidrólise) de inibir a oxidação do β -caroteno não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparada à da rutina (controle). É conhecido que apenas flavonóis com um grupo OH livre na posição C-3 do esqueleto do flavonoide mostram alta atividade inibitória sobre a oxidação do β -caroteno (Burda & Oleszek, 2001), como é o caso da quercetina.

A hidrofiliçidade aumentada dos glicosídeos de quercetina modifica os coeficientes de distribuição entre as fases aquosa e lipídica, fato que dificulta uma análise fidedigna destes compostos em sistemas lipídicos como TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox®) e emulsão de β -caroteno (Burda & Oleszek, 2001).

Outro fator que pode justificar as diferenças nos resultados de atividade antioxidante em relação aos métodos DPPH e β -caroteno é a natureza dos radicais utilizados na avaliação do potencial antioxidante. O método de descolorimento do β -caroteno gera radicais peroxila *in situ*, enquanto o DPPH utiliza radicais de nitrogênio (Huang *et al.*, 2005). As maiores porcentagens de atividade antioxidante observadas para a rutina, tanto antes como após a hidrólise enzimática, pelo método do DPPH, sugerem que a rutina e seus derivados provavelmente possuem maior afinidade por radicais de nitrogênio, em comparação com os radicais peroxila.

5.5. Inibição da xantina oxidase da rutina antes e após hidrólise enzimática

A Figura 13 mostra os efeitos inibitórios da rutina (controle), da quercetina padrão e da rutina hidrolisada obtida após 4, 8 e 12 horas de reação com hesperidinase em relação à atividade da XO.

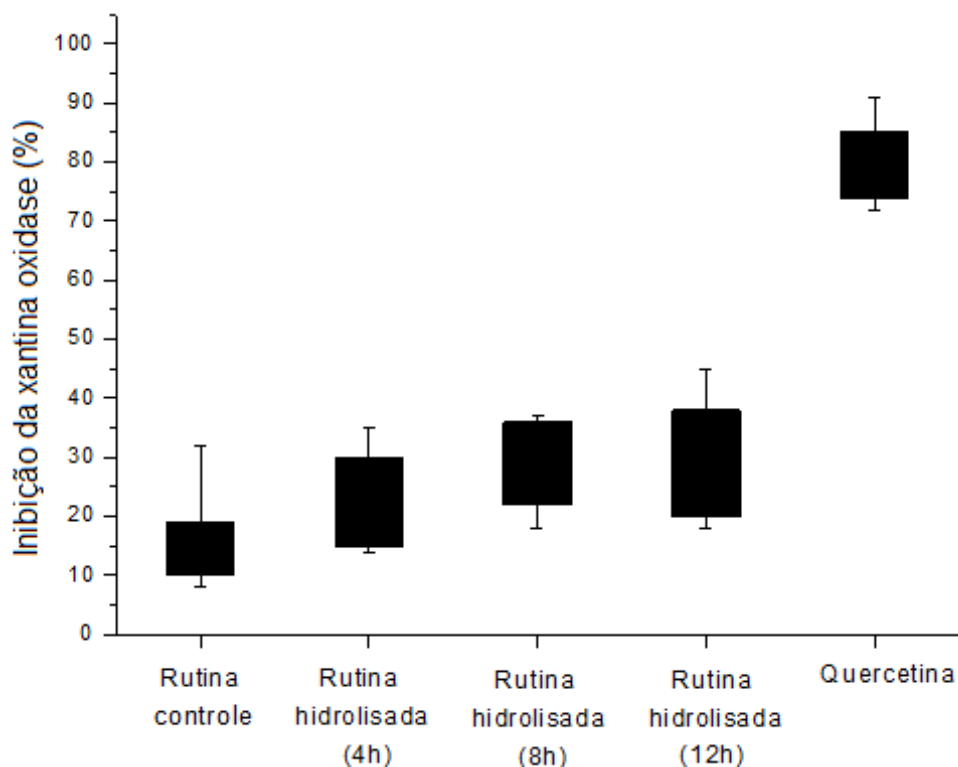


Figura 14. Efeitos inibitórios da rutina (controle), da quercetina padrão e da rutina hidrolisada obtida após 4, 8 e 12 horas de reação com hesperidinase na atividade da xantina oxidase

Os resultados demonstram não haver diferença significativa entre as atividades de inibição da XO para a rutina e a rutina hidrolisada nos diferentes tempos de hidrólise testados. Por outro lado, a quercetina aglicona exibiu a maior atividade de inibição da XO dentre os compostos analisados, mais de duas vezes superior à atividade inibitória da rutina hidrolisada, indicando que a Q3G possui menor capacidade de inibição dessa enzima, quando comparada à quercetina. Os diferentes tempos de hidrólise (4, 8 e 12 horas de reação) catalisada pela hesperidinase submetida a tratamento térmico (70°C – 30 minutos) não acarretaram diferenças estatisticamente significativas na atividade de inibição da XO. Este fato pode ser explicado

pelas quantidades de Q3G formadas nos diferentes tempos de reação (Figuras 10 e 11), conforme exposto no item 5.4.

Evidências indicam que a inibição da XO por flavonoides depende da localização e do número de grupos OH na molécula. A presença de 5-OH e de 7-OH, grupamentos que contribuem positivamente para a inibição da XO, proporcionam à molécula de quercetina uma alta capacidade de inibição dessa enzima (Nijveldt *et al.*, 2001).

Estudos indicam que a rutina possui uma atividade de neutralização de radicais em sistemas xantina/XO muito inferior à da quercetina, apesar de possuir um grupamento C(4')-OH livre no anel B (Lin *et al.*, 2002; Masuoka *et al.*, 2012).

Em diversos sistemas-modelo, os derivados da quercetina demonstraram menor atividade antioxidante em comparação com a aglicona livre (Burda & Oleszek, 2001; Materska & Perucha, 2005). Selloum *et al.* (2001) relataram que a quercetina, em concentrações de 50µM, inibiu em mais de 90% a atividade da XO, determinada pela quantidade de ácido úrico formada no sistema, enquanto a rutina se mostrou ineficaz. Os autores atribuíram a efetividade da quercetina na inibição da formação de ácido úrico à presença de um grupo catecol no anel B (3',4'-OH). Analisando a geração de O_2^- no sistema xantina/XO, os autores relataram que a quercetina exerceu efeito inibitório superior a 90% sobre esses radicais, enquanto a rutina foi capaz de inibir a formação desses radicais em apenas 20%. Os autores também observaram a inibição da redução do citocromo c exercida pela quercetina, atribuindo esse efeito a uma associação entre as atividades de inibição da XO, em maior grau, e de neutralização de radicais O_2^- . O valor de IC_{50} relatado para a inibição da XO pela quercetina, 1,5 µM, foi semelhante ao valor de 2,62 relatado por Cos *et al.* (1998). Nagao *et al.* (1999) relatam para a quercetina um valor de IC_{50} ainda menor, 0,44 µM.

Selloum *et al.* (2001) atribuíram a menor atividade de inibição da XO pela rutina à substituição do grupo 3-OH pelo resíduo o-ramnoglicosídico. Assim, a atividade inibitória menor para os derivados da quercetina se deve principalmente ao fato de substituintes (glicídicos, alcoxila, metóxi e outros) bloquearem os grupos OH responsáveis pela ação da molécula sobre a XO. De forma similar, Nagao *et al.* (1999) relataram que a ramnetina, um derivado da quercetina com uma substituição metóxi na posição 7-OH, demonstrou uma atividade de inibição da XO cem vezes inferior à da quercetina.

No presente estudo, a remoção da ramnose da molécula de rutina não foi eficaz em aumentar a atividade de inibição da XO, demonstrando que, conforme relatado na literatura, a

presença de uma molécula de glicose bloqueando a hidroxila do C3 do anel C do flavonoide contribui negativamente para a atividade de inibição dessa enzima, assim como a presença da rutinose.

5.6. Influência da hidrólise da rutina na atividade antiproliferativa *in vitro*

Os resultados referentes à atividade antiproliferativa dos compostos foram apresentados na forma de curvas de crescimento celular em função da concentração, conforme por ser visto na Figura 15. Valores positivos referem-se à atividade citostática do fármaco, ou seja, o fármaco inibe o crescimento celular sem afetar o número inicial de células. Os valores negativos referem-se ao efeito citotóxico, ou seja, o fármaco além de inibir por completo o crescimento celular causa uma redução no número inicial de células. Assim, o efeito citostático é observado quando $C > T > T_0$, enquanto o efeito citotóxico (ou citocida) pode ser verificado quando $T < T_0$. São considerados seletivos os compostos que apresentarem comportamento diferenciado sobre uma determinada linhagem celular em comparação com as demais testadas.

A partir das curvas foi construída uma tabela com os valores de concentrações das amostras necessários para reduzir em 50% o crescimento celular (GI_{50}).

A Figura 15 (A) representa a ação do quimioterápico doxorubicina e relaciona a porcentagem de crescimento das células com a concentração do quimioterápico. Na Figura 15 (B, C e D) são mostrados os gráficos da porcentagem de crescimento celular após 48 horas de incubação das células tumorais com os compostos-teste, rutina antes da hidrólise (controle), rutina hidrolisada e quercetina padrão. Os valores de GI_{50} estão representados na Figura 15 pela linha tracejada.

A doxorubicina, utilizada como controle positivo, demonstra elevada atividade e seletividade em baixas concentrações para a maioria das linhagens. A linhagem NCI/ADR-RES (linhagem de ovário, resistente a múltiplos fármacos) apresenta-se mais resistente a este quimioterápico, enquanto a linhagem UACC-62 (melanoma) é a mais sensível. Em todos os experimentos, a doxorubicina foi utilizada para avaliar se houve alteração de sensibilidade das linhagens durante o cultivo.

Tabela 8. Valores de inibição de crescimento celular (GI_{50}) ($\mu\text{g/mL}$) de cada linhagem testada para a doxorrubicina e amostras-teste

	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562
Doxorrubicina	0,025	<0,025	0,90	0,90	<0,025	0,069	0,033	0,091	0,032
Rutina (controle, antes do tratamento enzimático)	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Rutina hidrolisada com hesperidinase*	3,6	2,3	7,9	8,6	5,7	5,4	1,5	24,4	4,8
Quercetina	31,4	31,9	44,0	42,7	70,5	72,7	72,7	>250	>250

* Condições de hidrólise descritas no item 4.5

U251 (glioma), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-ADR/RES (ovário, linhagem com resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (adenocarcinoma renal), NCI-H460 (adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário), HT-29 (adenocarcinoma de cólon), K562 (leucemia mieloide crônica).

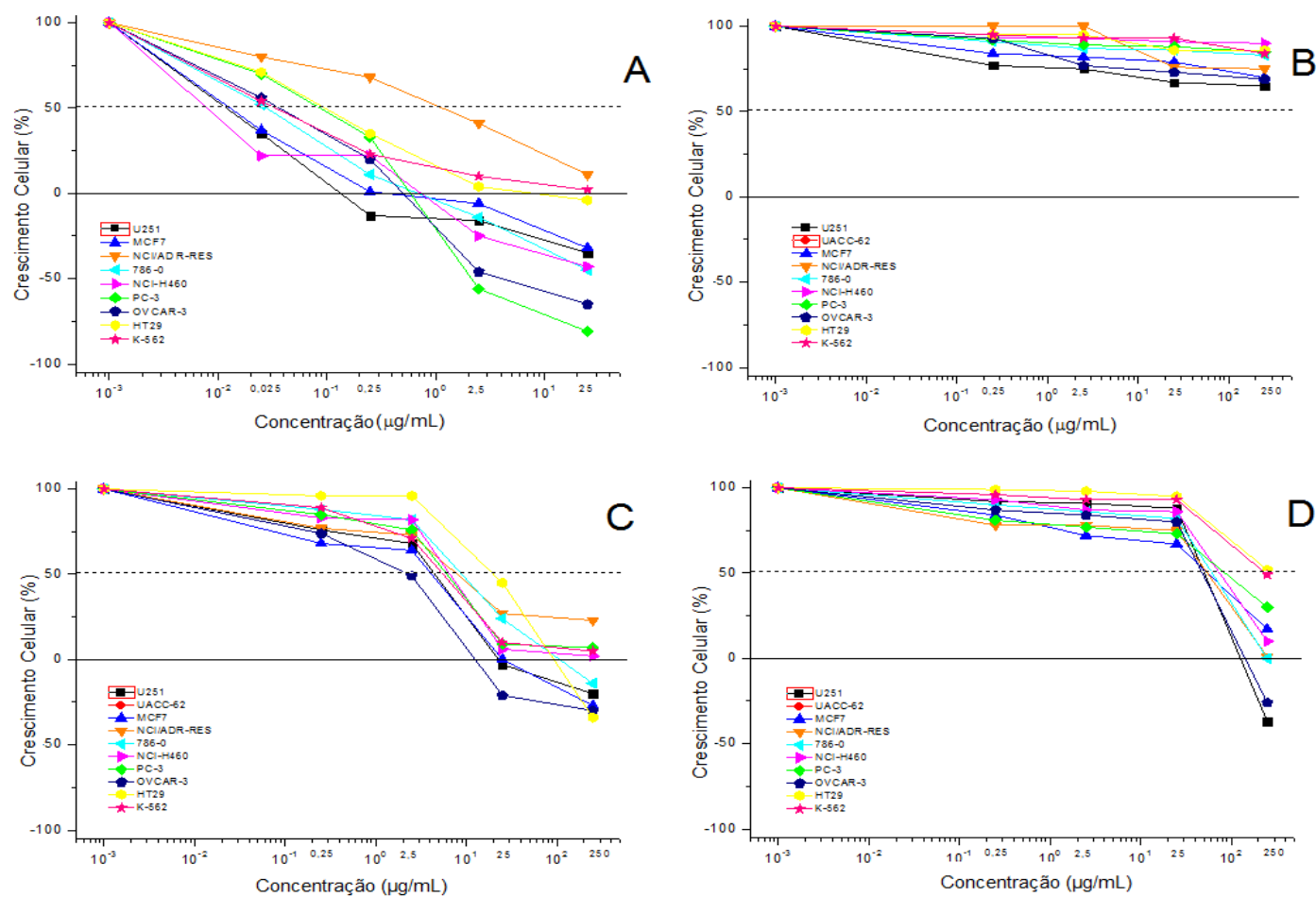


Figura 15. Atividade antiproliferativa da doxorubicina (A), rutina controle, antes do tratamento enzimático (B), rutina hidrolisada com hesperidina (C) e quercetina padrão (D) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento e concentração das amostras

U251 (glioma), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-ADR/RES (ovário, linhagem com resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (adenocarcinoma renal), NCI-H460 (adenocarcinoma pulmonar de células não-pequenas), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário), HT-29 (adenocarcinoma de cólon), K562 (leucemia mieloide crônica)

Os ensaios mostraram que a rutina hidrolisada (mistura composta por 69,5% de Q3G, 23% de rutina e 7,5% de quercetina) exerceu, em várias linhagens, um efeito antiproliferativo mais potente do que a quercetina e a rutina puras. A rutina hidrolisada mostrou alta atividade antiproliferativa para todas as linhagens testadas, com maior seletividade para OVCAR-3 (ovário, GI_{50} = 1,5 μ g/mL), MCF-7 (mama, GI_{50} = 2,3 μ g/mL) e U251 (glioma, GI_{50} = 3,6 μ g/mL), enquanto a quercetina apresentou atividade antiproliferativa moderada com seletividade para U251 (glioma, GI_{50} = 31,4 μ g/mL), MCF-7 (mama, GI_{50} = 31,9 μ g/mL), 786-0 (renal, GI_{50} = 42,7 μ g/mL) e NCI-ADR/RES (ovário, linhagem com resistência a múltiplos fármacos, GI_{50} = 44,0 μ g/mL). Em todas as linhagens de células tumorais, a rutina não demonstrou atividade de inibição da proliferação celular.

Diversos estudos relataram que a quercetina, mas não a rutina, demonstrou expressar efeitos antiproliferativos sobre células de câncer de cólon humanas, de forma dose-dependente e tempo-dependente (Kuo, 1996; Lamson & Brignall, 2000; Shen *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

Recentemente foi relatado que a Q3G produzida através da remoção da ramnose catalisada por extratos enzimáticos crus de *Aspergillus niger* mostrou efeitos inibitórios sobre o crescimento de tumores de cólon (HT-29 e HCT-116), mama (MCF-7), pulmão (A549) e hepatocelular (HepG2), com valores de IC_{50} entre 15 e 25 μ M, enquanto que os valores de IC_{50} para a quercetina foram maiores do que 80 μ M (You *et al.*, 2010). Os resultados encontrados no presente estudo se mostraram similares aos encontrados pelos referidos autores em relação à alta atividade antiproliferativa da Q3G na linhagem MCF-7, e à menor atividade antiproliferativa da quercetina nessa linhagem, quando comparada à atividade da Q3G.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados das atividades antioxidante e antiproliferativa obtidos para a rutina hidrolisada (contendo 69,5% de Q3G) indicam sua potencial aplicação terapêutica. Segundo relatos bibliográficos, a Q3G é absorvida de forma eficiente pelo organismo e possui alta biodisponibilidade, sendo assim, pode-se assumir que a administração oral da Q3G pode levar a efeitos potencialmente benéficos, em especial aqueles relacionados à sua atividade antioxidante e antitumoral. Esse composto pode atuar na prevenção e tratamento de diversas doenças, em especial o câncer, por sua capacidade de inibir danos oxidativos através do sequestro de radicais livres, e de inibir a proliferação de células de diversas linhagens tumorais.

Embora maiores investigações sobre a Q3G sejam necessárias no que diz respeito à sua atividade antiproliferativa em células saudáveis, e ensaios *in vivo*, dados da literatura relatam que a sua forma aglicona, a quercetina, possui atividade antiproliferativa seletiva, isto é, não exibe efeito citotóxico em células normais (Brusselmans *et al.*, 2005; Gibellini *et al.*, 2010).

Além disso, alguns estudos recentes relatam que os flavonoides, entre eles a quercetina, são capazes de prevenir ou reduzir a caquexia, síndrome que afeta pacientes já seriamente comprometidos pelo processo de desenvolvimento tumoral e que é responsável pela diminuição na qualidade e na expectativa de vida desses pacientes (Ekambaram *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2011, 2012). Pesquisas têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias estão diretamente implicadas na etiologia da caquexia, sugerindo que essa síndrome seja uma condição inflamatória crônica (McCarthy, 2003). Assim, a atividade anti-inflamatória dos flavonoides é potencialmente capaz de atenuar e/ou suprimir essa síndrome, possivelmente contribuindo para uma melhora na qualidade de vida e no prognóstico do paciente, aliada à sua capacidade de inibição do crescimento tumoral.

Outro ponto interessante do presente trabalho é o processo de obtenção da Q3G à partir da hidrólise enzimática da rutina realizado em meio aquoso e, desta forma, torna o composto obtido mais seguro sem necessidade de etapas posteriores para o isolamento da Q3G, constituindo uma alternativa nutracêutica viável e potencialmente vantajosa.

7. CONCLUSÃO

- A hidrólise ácida da rutina utilizando HCl 1M levou a formação de grandes quantidades de quercetina aglicona e menores taxas do produto de interesse, a Q3G. Já a hidrólise enzimática da rutina catalisada pela hesperidinase de *Penicillium* sp. foi capaz de retirar de forma seletiva a molécula de ramnose e, assim foi mais eficiente na síntese de Q3G ,

- O tratamento térmico da hesperidinase a 70°C por 30 minutos, realizado antes da reação de hidrólise da rutina, foi eficiente na redução da atividade de β -D-glicosidase da enzima, mantendo sua atividade de α -L-ramnosidase. Desta forma, foi possível obter cerca de 70% de Q3G na mistura de reação após 4 horas de hidrólise da rutina,

- Quando avaliadas pelo ensaio de DPPH, a rutina hidrolisada (mistura de 70% de Q3G e 7,5% de quercetina) mostrou maior atividade antioxidante comparada à rutina antes da hidrólise enzimática, o que mostra que a retirada da fração ramnose da rutina favorece o potencial de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila,

- O tratamento enzimático não promoveu incremento da atividade antioxidante da rutina quando avaliada pelos métodos do descoramento do β -caroteno e capacidade de inibição da xantina oxidase,

- Dentre os compostos analisados, ou seja quercetina padrão e rutina antes e após hidrólise, a quercetina é o flavonoide de maior potencial antioxidante, segundo dados obtidos pelo ensaio de DPPH e inibição da xantina oxidase,

- A Q3G demonstrou maior efeito antiproliferativo em relação à rutina e também a quercetina em diversas linhagens celulares tumorais, indicando que este pode ser um derivado funcional promissor obtido através da hidrólise enzimática da rutina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. The activity of flavonoids extracted from *Tanacetum microphyllum* DC (Compositae) on soybean lipoxygenase and prostaglandin synthetase. **General Pharmacology**, 26, p. 815–819, 1995.

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

ALI, A.; AKHTAR, N.; KHAN, B. A.; KHAN, M. S.; RASUL, A.; ZAMAN, S-U; KHALID, N.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T.; ALI, L. *Acacia nilotica*: a plant of multipurpose medicinal uses. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6(9), p. 1492-1496, 2012.

AMARO, M. I.; VILA-REAL JR., H.; EDUARDO-FIGUEIRA, M.; MOTA-FILIFE, H.; SEPODES, B.; RIBEIRO, M. H. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesized naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. **Food Research International**, 42, p. 1010-1017, 2009.

ARCHIVIO, M. D.; FILSEI, C.; BENEDETTO, R. D.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali del Istituto Superiore di Sanità**, 43(4), p. 348-361, 2007.

ARTS, I. C.; SESINK, A. L.; FAASSEN-PETERS, M.; HOLLMAN, P. C. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. **British Journal of Nutrition**, 91(6), p. 841-847, 2004.

ARTS, I. C.; SESINK, A. L.; HOLLMAN, P. C. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. **Journal of Nutrition**, 132, p. 2823; author reply 2824, 2002.

AZUMA, K.; MINAMI, Y.; IPPOUSHI, K.; TERAQ, J. Lowering effects of onion intake on oxidative estresse biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 40, p. 131-140, 2007.

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

BILBAO, M. L. M.; ANDRES-LACUEVA, C.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. **Food Chemistry**, 101, p. 1742-1747, 2007.

BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 90, p.157-77, 2001.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. The flavonoids: new perspectives in biological activities and therapeutics. **Chimica Oggi**, 11, p. 25–28, 1993.

BOYLE, S. P.; DOBSON, V. L.; DUTHIE, S. J.; HINSELWOOD, D. C.; KYLE, J. A. M.; COLLINS, A. R. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. **European Journal of Clinical Nutrition**, 54, p. 774-782, 2000.

BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L. L.; CANEDO, A. D.; HORN, F.; TAMAJUSUKU, A. S.; WINK, M. R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A. M. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anticancer Drugs**, 17(6), p. 663-671, 2006.

BRUSSELMANS, K.; VROLIX, R.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(7), p. 5636–5645, 2005.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, p. 2774–2779, 2001.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, 58(1), p. 69-72, 2001.

CAMARGO, C. A.; DA SILVA, M. E. F.; DA SILVA, R. A.; JUSTO, G. Z.; GOMES-MARCONDES, M. C. C.; AOYAMA, H. Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 406(4), p. 638–642, 2011.

CAMARGO, C. A.; GOMES-MARCONDES, M. C. C.; WUTZKI, N. C.; AOYAMA, H. Naringin inhibits tumor growth and reduces interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels in rats with Walker 256 carcinosarcoma. **Anticancer Research**, 32(1), p. 129-133, 2012.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, 22(5), p. 749-760, 1997.

- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. JR. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews**, 5, p. 65-71, 2005.
- CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S.; HO, W. K. K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 59(3), p. 549-555, 2005.
- CHANG, W. S.; LEE, Y. J.; LU, F. J.; CHIANG, H. C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. **Anticancer Research**, 13(6A), p. 2165-2170, 1993.
- CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R. Prediction of *Dimorphandra mollis* Benth. ("faveiro") seed longevity. **Revista Brasileira de Botânica**, 26(4), p. 557-564, 2003.
- CHEN, T. J.; JENG, J. Y.; LIN, C. W.; WU, C. Y.; CHEN, Y. C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. **Toxicology**, 223, p. 113–126, 2006.
- CORNARD, J. P.; BOUDET, A. C.; MERLIN, J. C. Theoretical investigation of the molecular structure of the isoquercitrin molecule. **Journal of Molecular Structure**, 508(1-3), p. 37-49, 1999.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, 61, p. 71-76, 1998.
- COTELLE, N.; BERNIER, J-L.; CATEAU, J-P; POMMERY, J.; WALLET, J-C; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology and Medicine**, 20, p. 35-43, 1996.
- CUYCKENS, F.; AA, S.; PIETERS, L.; CLAEYS, M. Direct stereochemical assignment of hexose and pentose residues in flavonoid O-glycosides by fast atom bombardment and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 37, p. 1272–1279, 2002.
- DAY, A. J.; GEE, J. M.; DUPONT, M. S.; JOHNSON, I. T.; WILLIAMSON, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercitrin-4-glucoside in the rat small intestine: role of lactase phlorizin hydrolase and sodium-dependent glucose transporter. **Biochemical Pharmacology**, 65, p. 1199-1206, 2003.

DE RIJKE, E.; ZAPPEY, H.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. **Journal of Chromatography A**, 984, p. 45–58, 2003.

DESCHNER, E. E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, 12, p. 1193–1196, 1991.

EKAMBARAM, G.; RAJENDRAN, P.; MAGESH, V.; SAKTHISEKARAN, D. Naringenin reduces tumor size and weight lost in *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine–induced gastric carcinogenesis in rats. **Nutrition Research**, 28(2), p. 106-112, 2008.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; ABOU EL-NAGA, N. I. Biochemical study on the hypoglycemic effects on onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, 43, p. 57-63, 2005.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. **Nutrition Research**, 24(10), p. 851-874, 2004.

ERLUND, I.; SILAST, M. L.; ALFTHAN, G.; RANTALA, M.; KESANIEMI, Y. A.; ARO, A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and high or low in fruits and vegetables. **European Journal of Clinical Nutrition**, 56(9), p. 891-898, 2002.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; DE HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 12, p. 707–715, 2001.

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, p. 6896-6902, 2005.

FERNANDEZ, J.; REYES, R.; PONCE, H.; OROPEZA, M.; VAN CALSTEREN, M-R; JANKOWSKI, C.; CAMPOS, M.G. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. **European Journal of Pharmacology**, 522, p. 108-115, 2005.

GALLEGO, M. V.; PIÑAGA, F.; RAMÓN, D.; VALLÉS, S. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. **Journal of Food Science**, 66(2), p. 204-209, 2001.

GALLUZZO, P.; MARTINI, C.; BULZOMI, P.; LEONE, S.; BOLLI, A.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant *versus* estrogen receptor α -dependent mechanisms. **Molecular Nutrition & Food Research**, 53(6), p. 699–708, 2009.

GANESH, D.; FUEHRER, H-P; STARZENGRÜBER, P.; SWOBODA, P.; KHAN, W. A.; REISMANN, J. A. B.; MUELLER, M. S. K.; CHIBA, P.; NOEDL, H. Antiplasmodial activity of flavonol quercetin and its analogues in *Plasmodium falciparum*: evidence from clinical isolates in Bangladesh and standardized parasite clones. **Parasitology Research**, DOI 10.1007/s00436-011-2763-z. Disponível on-line em <http://www.springerlink.com/content/704q42263361hg82/>. Acesso em 17/04/2012.

GAREGG, P. J. Synthesis and reaction of glycosides. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, 59, p. 69-134, 2004.

GASPAROTTO JR., A.; GASPAROTTO, F. M.; BOFFO, M. A.; LOURENÇO, E. L. B.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin—an active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 134(2), p. 210–215, 2011.

GERSTORFEROVÁ, D.; FLIEDROVÁ, B.; HALADA, P.; MARHOL, P.; KREN, V.; WEIGNEROVÁ, L. Recombinant α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin. **Process Biochemistry**, 47(5), p. 828-835, 2012.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; DE BIASI, S.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COSSARIZZA, A. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin. **Cancers**, 2, p. 1288-1311, 2010.

GONZÁLES-BARRIO, R.; TRINDADE, L. M.; MANZANARES, P.; DE GRAAFF, L. H.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, p. 6136-6142, 2004.

GOUPY, P.; DUFOUR, C.; LOONIS, M.; DANGLES, O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p. 615–622, 2003.

GRAEFE, E. U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A. K.; UEHLEK, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, 41, p. 492-499, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ª edição. Oxford: Oxford University Press, 1998.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, 16, p. 845-850, 1994.

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), p. 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, p. 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), p. 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, p. 21-29, 1993.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in fruits and vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, p. 1591-1598, 1992.

HOLLMAN, P. C. H.; 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, p. 569-573, 1999.

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

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 51, p. 305-310, 1997.

HSU, Y-L; KUO, P-L; LIU, C-F; LIN, C-C. Acacetin induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Cancer Letters**, 212, p. 53-60, 2004.

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

IHME, N.; KIESEWETTER, H.; HOFFMAN, K. H.; BIRK, A.; MULLER, A.; GRUTZNER, K. I. Leg edema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-center, randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 50, p. 443–447, 1996.

IIO, M.; ONO, Y.; KAI, S.; FUKUMOTO, M. Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, 32(6), p. 635-642, 1986.

INCA. Estimativa 2012 – Incidência de câncer no Brasil. 121 p., 2011. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em 18/05/2012.

IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Antiulcer effects of flavonoids: role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, 8, p. 179–181, 1994.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. **Toxicology Letters**, 132(1), p. 19–25, 2002.

JO, S-H; KA, E-H; LEE, H-S, APOSTOLIDIS, E.; JANG, H-D; KWON, Y-I. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin and isoquercetin. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, 2(4), p. 52-60, 2010.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(8), p. 4076-4082, 2001.

KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 63(5), p. 896-899, 1999.

KIM, G-N.; KWON, Y-I.; JANG, H-D. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, 25(1), p. 138-144, 2011.

KIM, S. J.; KIM, G. H. Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. **Food Science and Biotechnology**, 15, p. 39-43, 2006.

KIM, W. K.; BANG, M. H.; KIM, E. S. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 16, p. 155–162, 2005.

KIRMIZIBEKMEZ, H.; CALIS, I.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; DONMEZ, A. A.; LINDEN, A.; RUEDI, P.; TASDEMIR, D. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. **Planta Medica**, 70(8), p. 711-717, 2004.

KNOWLES, L. M.; ZIGROSSI, D. A.; TAUBER, R. A.; HIGHTOWER, C.; MILNER, J. A. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. **Nutrition and Cancer**, 38(1), p. 116-122, 2000.

KRASTEVA, I.; NIKOLOV, S. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*. **Química Nova**, 31(1), p. 59-60, 2008.

KREFT, S.; KNAPP, M.; KREFT, I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) seeds and determination by capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(11), p. 4649–52, 1999.

KROON, P. A.; CLIFFORD, M. N.; CROZIER, A.; DAY, A. J.; DONOVAN, J. L.; MANACH, C.; WILLIAMSON, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? **The American Journal of Clinical Nutrition**, 80, p. 15-21, 2004.

KUMAR, R. V.; CHAUHAN, S. Mulberry: life enhancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, 2(10), p. 271-278, 2008.

KUO, S. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. **Cancer Letters**, 110, p. 41–48, 1996.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, 38, p. 133-142, 1999.

KWON, O.; ECK, P.; CHEN, S.; CORPE, C. P.; LEE, J. H.; KRUHLAK, M.; LEVINE, M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **The FASEB Journal**, 21, p. 366-377, 2007.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTÍN CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, 71, p. 45–53, 2000.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 501(1), p. 65-72, 2010.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. **Alternative Medicine Review**, 5, p. 196-208, 2000.

LEUNG, H. W-C; KUO, C-L; YANG, W-H; LIN, C-H; LEE, H-Z. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, 534, p. 12-18, 2006.

LIN, C-M; CHEN, C-S; CHEN, C-T; LIANG, Y-C; LIN, J-K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 294, p. 167-172, 2002.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. **Inflammation**, 21, p. 347–356, 1997.

LIPKIN, M.; REDDY, B.; NEWMARK, H.; LAMPRECHT, S. A. Dietary factors in human colorectal cancer. **Annual Review of Nutrition**, 19, p. 545-586, 1999.

LOA, J.; CHOW, P.; ZHANG, K. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 63, p. 1007–1016, 2009.

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), p. 491-497, 2011.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. **Food Chemistry**, 117(4), p. 615-620, 2009.

MAMANI-MATSUDA, M.; RAMBERT, J.; MALVY, D.; LEJOLY-BOISSEAU, H.; DAULOUEDE, S.; THIOLAT, D.; COVES, S.; COURTOIS, P.; VINCENDEAU, P.; MOSSALAYI, M. D. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(3), p. 924-929, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÈMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79(5), p. 727-747, 2004.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÈMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81, p. 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), p. 198-202, 2000.

MARTÍN, M.; SERRANO, A.B.G.; RAMOS, S.; PULIDO, M.I.; BRAVO, L.; GOYA, L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 21, p. 196-205, 2010.

MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. **Food Chemistry**, 131, p. 541-545, 2012.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, p. 1750–1756, 2005.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 370(1-2), p. 202-209, 2009.

MCCARTHY, D. O. Rethinking Nutritional Support for Persons with Cancer Cachexia. **Biological Research for Nursing**, 5(1), p. 3-17, 2003.

MERKEN, H. M.; MERKEN, C. D.; BEECHER, G. R. Kinetic method for the quantitation of flavonoids as aglycones in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(6), p. 2727-2732, 2001.

METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. **Biochemistry and Molecular Biology International**, 41, p. 1067–1075, 1997.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1971. DOI 10.1007/BF02635693. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/a611148115g4q177/>. Acesso em 04/07/2011.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, 6(6), p. 527-541, 2000.

MIYAKE, T.; YUUMOTO, T. Enzyme treated hesperidin, process for producing the same and method for using enzyme. US Patent 5,885,969; 1999.

MIZUMA, T.; OHTA, K.; HAYASHI, M.; AWAZU, S. Intestinal active absorption of sugar-conjugated compounds by glucose transport system: implication of improvement of poorly absorbable drugs. **Biochemical Pharmacology**, 43, p. 2037-2039, 1992.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, 83, p. 757-766, 1991.

MONTI, D.; PISVEJCOVA, A.; KREN, V.; LAMA, M.; RIVA, S. Generation of an α -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. **Biotechnology and Bioengineering**, 87(6), p. 763–71, 2004.

MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology In Vitro**, 20, p.187-210, 2006.

MORAND, C.; MANACH, C.; CRESPIY, V.; REMESY, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. **Free Radical Research**, 33(5), p. 667-676, 2000.

MOTOYAMA, K.; KOYAMA, H.; MORIWAKI, M.; EMURA, K.; OKUYAMA, S.; SATO, E.; INOUE, M.; SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y. Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. **Nutrition**, 25(4), p. 421-427, 2009.

NAGAO, A.; SEKI, M.; KOBAYASHI, H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 63(10), 1787-1790, 1999.

NEGRÉ-SALVAYRE, A.; AFFANY, A.; HARITON, C. R. Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. **Pharmacology**, 42, p. 262-272, 1991.

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 β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, 42, p. 29-42, 2003.

NIELSEN, I. L. F.; CHEE, W. S. S.; POULSEN, L.; OFFORD-CAVIN, E.; RASMUSSEN, S. E.; FREDERIKSEN, H.; ENSLEN, 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, p. 404-408, 2006.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELENS, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, 74(4), p. 418-425, 2001.

- NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K-M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**, 76(4), p. 519-525, 2002.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; VREE, T. B.; KATAN, M. B. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. **Journal of Nutrition**, 130(5), p. 1200-1203, 2000.
- OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, p. 1746–1750, 1996.
- PARAVICIN, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, 31, p. 171-180, 2008.
- 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 Agricultural and Food Chemistry**, 54, p. 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 α -reductase inhibition. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 70(2), p. 387-394, 2006b.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; SATO, H.H. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal beta-glucosidase. **Food Science and Industry**, 34(4), p. 14-19, 2001.
- PEREIRA, M. A.; GRUBBS, C. J.; BARNES, L.H.; LI, H.; OLSON, G. R.; ETO, I.; JULIANA, M.; WHITAKER, L. M.; KELOFF, G. J.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. **Carcinogenesis**, 17(6), p. 1305-1311, 1996.
- PÉREZ-GUERRERO, C.; MARTÍN, M. J.; MARHUENDA, E. Prevention by rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: role of prostaglandins. **General Pharmacology**, 25, p. 575–580, 1994.
- PIERINI, R.; GEE, J. M.; BELSHAW, N. J.; JOHNSON, I. T. Flavonoids and intestinal cancers. **British Journal of Nutrition**, 99 (E-Suppl. 1), p. ES53–ES59, 2008.

- POTAPOVICH, A. I.; KOSTYUK, V. A. Comparative Study of Antioxidant Properties and Cytoprotective Activity of Flavonoids. **Biochemistry**, 68(5), p. 514-519, 2003.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, 82, p. 513-523, 2011.
- REINBOTH, M.; WOLFFRAM, S.; ABRAHAM, G.; UNGEMACH, F. R.; CERMAK, R. Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. **British Journal of Nutrition**, 104, p. 198-203, 2010.
- RIVELLI, D. P. ; ALMEIDA, R.L. ; ROPKE, C.D. ; BARROS, S.B.M. Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 59, p. 8901-8907, 2011.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKY, R. J. Bioactivity of flavonoids. **Polish Journal of Pharmacology & Pharmacy**, 48, p. 555–564, 1996.
- RODRIGUES, A. S.; PÉREZ-GREGORIO, M. R.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J.; ALMEIDA, D. P. F. Effect of meteorological conditions on antioxidant flavonoids in Portuguese cultivars of white and red onions. **Food Chemistry**, 124(1), p. 303-308, 2011.
- ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; DA SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, 56, p. 402-408, 2007.
- ROSEGHINI, R.; FALCÃO, G. M.; OLIVEIRA COSTA, J. F.; CLARÊNCIO, J.; NASCIMENTO, I.; VELOZO, E.; SCHAER, R.; VALE, V.; COSTA, S. L.; COSTA, M. F. D.; TARDY, M.; MEYER, R.; MENEZES FREIRE, S. The flavonoid rutin but not the alkaloid arborinine induces apoptosis in a B-cell hybridoma cell line. **Planta Medica**, 75(5), p. 488-493, 2009.
- RUAN, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Evaluation of the Antioxidant Activity of Syzygium cumini Leaves. **Molecules**, 13, p. 2545-2556, 2008.
- 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, p. 382-389, 2010.

SALIM, E. I.; KANEKO, M.; WANIBUCHI, H.; MORIMURA, K.; FUKUSHIMA, S. Lack of carcinogenicity of enzymatically modified isoquercitrin in F344/DuCrj rats. **Food and Chemical Toxicology**, 42(12), p. 1949-1969, 2004.

SANTOS, B. L.; SILVA, A. R.; PITANGA, B. P. S.; SOUSA, C. S.; GRANGEIRO, M. S.; FRAGOMENI, B. O.; COELHO, P. L. C.; OLIVEIRA, M. N.; MENEZES-FILHO, N. J.; COSTA, M. F. D.; EL-BACHÁ, R. S.; VELOZO, E. S.; SAMPAIO, G. P.; FREIRE, S. M.; TARDY, M.; COSTA, S. L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, 127, p. 404-411, 2011.

SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, G. (Ed.). **Methods in polyphenol analysis**. London: Royal Society of Chemistry, 2003, 383 p.

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

SELLOUM, L.; REICHL, S.; MÜLLER, M.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 395(1), p. 49-56, 2001.

SEN, G.; MANDAL, S.; SAHA ROY, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BISWAS, T. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. **Free Radical Biology & Medicine**, 38(9), p. 1257-1264, 2005.

SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, 67(18), p. 2058-2070, 2006.

SHEN, S. C.; CHEN, Y. C.; HSU, F. L.; LEE, W. R. Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. **Journal of Cellular Biochemistry**, 89, p. 1044-1055, 2003.

SHEU, J. R.; HSIAO, G.; CHOU, P. H.; SHEN, M. Y.; CHOU, D. S. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(14), p. 4414-4418, 2004.

SHIMADA, Y.; DEWA, Y.; ICHIMURA, R.; SUZUKI, T.; MIZUKAMI, S.; HAYASHI, S.; SHIBUTANI, M.; MITSUMORI, K. Antioxidant enzymatically modified isoquercitrin suppresses the development of liver preneoplastic lesions in rats induced by [beta]-naphthoflavone. **Toxicology**, 268(3), p. 213-218, 2010.

SHOSKES, D. A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury. **Transplantation**, 66(2), p. 147-152, 1998.

SI, D.; WANG, Y.; ZHOU, Y.H.; GUI, Y.; WANG, J.; ZHOU, H.; LI, Z-S.; FAWCETT, J. P. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. **Drug Metabolism and Disposition**, 37, p. 629-634, 2009.

SILVA, C. G.; RAULINO, R. J.; CERQUEIRA, D. M.; MANNARINO, S. C.; PEREIRA, M. D.; PANEK, A. D.; SILVA, J. F. M.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A. In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. **Phytomedicine**, 16(8), p. 761-767, 2009.

SILVA, C. M. G. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de bebidas contendo polifenóis biotransformados**. Bragança Paulista: USF, 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2011.

SILVA, M. M.; SANTOS, M. R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, 36(11), p. 1219-1227, 2002.

SIMIC, A.; MANOJLOVIC, D.; SEGAN, D.; TODOROVIC, M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. **Molecules**, 12, p. 2327-2340, 2007.

SINGER, J. Z.; WALLACE, S. L. The allopurinol hypersensitivity syndrome. Unnecessary morbidity and mortality. **Arthritis & Rheumatism**, 29(1), p. 82-87, 1986.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, 82(13), p. 1107-1112, 1990.

SOPONAR, F.; MO, A. C.; SRBU, C. High-performance thin-layer chromatography and three-dimensional image analysis for the determination of rutin in pharmaceutical preparations. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, 93(3), p. 804-810, 2010.

SOUNDARARAJAN, R.; WISHART, A. D.; RUPASINGHE, H. P.V.; ARCELLANA-PANLILIO, M.; NELSON, C. M.; MAYNE, M.; ROBERTSON, G. S. Quercetin 3-glucoside

protects neuroblastoma (SH-SY5Y) cells *in vitro* against oxidative damage by inducing sterol regulatory element-binding protein-2-mediated cholesterol biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, 283(4), p. 2231-2245, 2008.

SPENCER, J. P. E.; EL MOHSEN, M. M. A.; RICE-EVANS, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 423(1), p. 148-161, 2004.

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

TAKAHAMA, U.; TANAKA, M.; HIROTA, S.; YAMAUCHI, R. Formation of an oxathiolone compound from rutin in acidic mixture of saliva and buckwheat dough: possibility of its occurrence in the stomach. **Food Chemistry**, 116(1), p. 214-219, 2009.

TANG, D-Q.; WEI, Y-Q.; GAO, Y-Y.; YIN, X-X.; YANG, D-Z.; MOU, J.; JIANG, X-I. Protective effects of rutin on rat glomerular mesangial cells cultured in high glucose conditions. **Phytotherapy Research**, 25, p. 1640–1647, 2011.

TAVARES, L.; FORTALEZAS, S.; CARRILHO, C.; MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D.; FERREIRA, R. B.; SANTOS, C. N. Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. **Journal of Berry Research**, 1, p. 3-12, 2010.

TOURNAIRE, C., CROUX, S., MAURETTE, M.-T., BECK, I., HOCQUAUX, M., BRAUN, A. M., OLIVEROS, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology. Biology**, 19, p. 205-215, 1993.

VILA-REAL, H.; ALFAIA, A. J.; BRONZE, M. R.; CALADO, A. R. T.; RIBEIRO, M. H. L. Enzymatic Synthesis of the Flavone Glucosides, Prunin and Isoquercetin, and the Aglycones, Naringenin and Quercetin, with Selective α -L-Rhamnosidase and β -D-Glucosidase Activities of Naringinase. **Enzyme Research**, 2011, p. 1-11, 2011.

WACH, A.; PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, 100(2), p. 699-704, 2007.

WALGREN, R. A.; LIN, J. T.; KINNE, R. K.; WALLE, T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 294, p. 837-843, 2000.

- 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., editors. **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, p. 349-362, 2003.
- WANG, J.; LU, D. Q.; ZHAO, H.; WANG, J. L.; JIANG, B.; LING, X. Q.; CHAI, H.; OUYANG, P. K. Discrimination and classification tobacco wastes by identification and quantitation of polyphenols with LC-MS/MS. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 75(7), p. 875-891, 2010.
- WANG, J.; ZHAO, L-L; SUN, G-X; LIANG, Y.; WU, F-A; CHEN, Z.; CUI, S. A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. **African Journal of Biotechnology**, 10(8), p. 1460-1466, 2011.
- WANG, Y.; CHAN, F. L.; CHEN, S.; LEUNG, L. K. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. **Life Sciences**, 77, p.39-51, 2005.
- WEISS, L. M.; MA, Y. F.; TAKVORIAN, P. M.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 estresse response. **Infection and Immunity**, 66(7), p. 3295-3302, 1998.
- WILLIAMSON, G.; PLUMB, G. W.; UDA, Y.; PRICE, K. R.; RHODES, M. J. C. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. **Carcinogenesis**, 17(11), p. 2385-2387, 1996.
- WINKELMAN, M. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. **Medical Anthropology: Cross-Cultural Studies in Health and Illness**, 11(3), p. 255-268, 1989.
- WINKELMAN, M. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. **Journal of Ethnopharmacology**, 18(2), p. 109–131, 1986.
- WOLFFRAM, S.; BLÖCK, M.; ADER, P. Quercetin-3-Glucoside Is Transported by the Glucose Carrier SGLT1 across the Brush Border Membrane of Rat Small Intestine. **The Journal of Nutrition**, 132(4), p. 630-635, 2002.
- XIAO, D.; ZHU, S.P.; GU, Z.L. Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cell. **Acta Pharmacologica Sinica**, 18, p. 280-283, 1998.

YADAV, P. K.; YADAV, S.; YADAV, K. D. S. α -L-rhamnosidase: a review. **Process Biochemistry**, 45(8), p. 1226-1235, 2010.

YAN, Z.; CALDWELL, G. Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 1, p. 403–425, 2001.

YANG, K.; LAMPRECHT, S. A.; LIU, Y.; SHINOZAKI, H.; FAN, K.; LEUNG, D.; NEWMARK, H.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J.; LIPKIN, M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, 21(9), p. 1655-1660, 2000.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T. NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, 21, p. 381-406, 2001.

YANG, J.; QIAN, D.; JIANG, S.; SHANG, E-X; GUO, J.; DUAN, J-A. Identification of rutin deglycosylated metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. **Journal of Chromatography B**, DOI 10.1016/j.jchromb.2012.04.024. Disponível on-line em [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002321200](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023212002498)

2498. Acesso em 10/05/2012.

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, p. 139-151, 2008.

YANG, J.; LIU, R. H. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3- β -D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(18), p. 8581–8586, 2009.

YOSHIDA, M.; SAKAI, T.; HOSOKAWA, N.; MARUI, N.; MATSUMOTO, K.; FUJIOKA, A.; NISHINO, H.; AOIKE, A. The effect of quercetin of cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. **FEBS Letters**, 260, p. 10-13, 1990.

YOU, H. J.; AHN, H. J.; JI, G. E. Transformation of rutin to antiproliferative quercetin-3-glicoside by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(20), p. 10886-10892, 2010.

ZIAEE, A.; ZAMANSOLTANI, F.; NASSIRI-ASL, M.; ABBASI, E. Effects of rutin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104(3), p. 253-258, 2009.

ZVERLOV, V. V.; HERTEL, C.; BRONNENMEIER, K.; HROCH, A.; KELLERMANN, J.; SCHWARZ, W. H. The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -l-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. **Molecular Microbiology**, 35(1), p. 173–9, 2000.