



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

TAIS MOALA

**EXTRATOS BIOTRANSFORMADOS DE FENÓLICOS DE CÍTRICOS E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*.**

CAMPINAS
2016

TAIS MOALA

**EXTRATOS BIOTRANSFORMADOS DE FENÓLICOS DE CÍTRICOS E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição, na área de concentração Nutrição experimental e aplicada à tecnologia de alimentos.

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA TAIS MOALA
E ORIENTADA PELA PROF^ª. DR^ª. JULIANA ALVES MACEDO

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 130811/2014-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M711e Moala, Tais, 1989-
Extratos biotransformados de fenólicos de cítricos e atividade anti-inflamatória *in vitro* / Tais Moala. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Cítricos. 2. Biotransformação. 3. Inflamação. 4. Macrófagos. I. Macedo, Juliana Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biotransformed extracts from citrus phenolics and anti-inflammatory activity *in vitro*

Palavras-chave em inglês:

citrus
Biotransformation
Inflammation
macrophages

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Juliana Alves Macedo [Orientador]
Flávia Maria Netto
Eliana Setsuko Kamimura

Data de defesa: 17-06-2016

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Macedo
Orientadora
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Flavia Maria Netto
Membro Titular
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Eliana Setsuko Kamimura
Membro Titular
Faculdade de Engenharia de Alimentos/USP

Dr. José Valdo Madeira Junior
Membro Suplente
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Tasca Gois Ruis
Membro Suplente
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,
Biológicas e Agrícolas- CPQBA/UNICAMP

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmico do aluno.

DEDICATÓRIA

À minha mãe e ao meu pai,
os quais foram meu suporte para
que eu realizasse este sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof^a. Dr^a. Juliana Alves Macedo, pela orientação, por todos os ensinamentos que contribuíram para a minha formação, paciência, carinho e oportunidade de realizar este trabalho.

À professora Dr^a. Gabriela Alves Macedo, por ter cedido um espaço em seu laboratório para que eu realizasse este trabalho e por tudo que me ajudou.

À banca, Flavia, Eliana, José Valdo e Ana Lúcia pelas correções e pela disposição em ajudar na escrita final da tese.

À Fernanda, por todo conhecimento passado, pela cumplicidade e empenho em tudo que faz.

À minha prima Camila, que mesmo longe, esteve sempre ao meu lado, me ouvindo, me apoiando e que é e, sempre será minha irmã.

À Amanda, que foi mais do que uma amiga, foi uma confidente, um apoio e me ajudou muito sempre que eu precisei.

À Tássia e a Aline, companheiras de apartamento, que sempre foram um exemplo a ser seguido para mim, tanto pessoal como profissional. Agradeço pelas palavras de incentivo, pelas broncas e por serem a minha família aqui em Campinas.

Ao meu namorado, Guilherme, por sempre estar disposto a me ouvir, me aconselhar e a me incentivar em tudo. Obrigada pelas conversas e risadas nos momentos de maiores angústias.

Á minha mãe que sempre esteve ao meu lado para me ouvir e me ajudar em tudo que eu precisei. Ao meu pai, exemplo de guerreiro, que fez da sua vida um espelho para mim, que nos momentos que precisei veio me visitar aqui em Campinas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa desenvolvido pelo organismo com o objetivo de combater infecções (originadas por vírus, bactérias ou outros patógenos) e também injúrias (cortes ou queimaduras). Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos em muitos produtos derivados de plantas e apresentam uma gama de propriedades benéficas para a saúde humana, como atividade antioxidante e anti-inflamatória. A atividade antioxidante desses compostos está relacionada com a presença de anéis benzênicos que capturam elétrons e as atividades anti-inflamatórias são justificadas pela capacidade desses fenólicos em inibir a ativação da via bioquímica do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e conseqüentemente, bloquear a transcrição de citocinas inflamatórias. Por essas características, esses compostos poderiam ter papel complementar às terapias convencionais já estabelecidas, no tratamento das doenças inflamatórias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório dos extratos resultantes de dois processos de biotransformação (enzimático e fermentativo) de resíduos de cítricos, em modelo *in vitro*. As células da linhagem RAW 264,7 (macrófagos de murinos) foram cultivadas, as respostas inflamatórias foram estimuladas por lipopolissacarídeos e os extratos foram adicionados a seguir, no meio celular. A capacidade dos extratos em modular a produção de óxido nítrico foi avaliada pela reação de Griess e a influência na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias foram analisadas pelo método de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O extrato enzimático apresentou o melhor resultado nas duas concentrações testadas na análise da modulação da produção do óxido nítrico. Em relação à produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) pelas células, todas as amostras foram eficazes em reduzir a concentração desta citocina na presença de 1 mg/mL dos extratos. Entretanto, apenas o extrato fermentado foi eficiente em reduzir a secreção da interleucina 6 (IL-6) no meio celular. Nos resultados da produção de interleucina 10 (IL-10), nenhuma amostra foi eficiente em aumentar significativamente o teor desta citocina anti-inflamatória, demonstrando que essa não deve ser a via pela qual esses compostos atuam como anti-inflamatórios.

Palavras chave: Cítricos, Biotransformação, Inflamação, Macrófagos.

ABSTRACT

The inflammatory process is a defense mechanism developed by the body in order to fight infections (caused by viruses, bacteria or other pathogens) and also injuries (cuts or burns). The phenolic compounds are widely distributed in many products derived from plants and have a range of beneficial properties for the human health as antioxidant and anti-inflammatory activities. Recent studies indicate that the antioxidant activity of these compounds is related to the presence of benzene rings which capture electrons, and anti-inflammatory activities are explained by the ability of these phenolic to inhibit activation of the nuclear factor-kB (NF-kB) and therefore block the transcription of inflammatory cytokines. Given these characteristics, these compounds may play a complementary role to conventional therapies established in the treatment of inflammatory diseases. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory potential of the extracts produced by two biotransformation processes (an enzymatic and a fermentation process) of *citrus* residues, in a model of inflammation *in vitro*. Cells of the strain RAW 264.7 (murine macrophage) were grown, and inflammatory responses were stimulated by lipopolysaccharides. The samples were added to the cell medium and the ability of the extracts to modulate the production of nitric oxide was assessed by the Griess reaction, and the influence on secretion of pro and anti-inflammatory cytokines was assayed by the method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The enzymatic extract showed the best result in the two concentrations tested in the analysis of the modulation of the production of nitric oxide. Related to the production of tumor necrosis factor (TNF α) by the cells, all samples were effective reducing the content of this cytokine at the concentration in the presence of 1 mg / mL of the extracts. However, only the fermented sample was effective in reducing the secretion of interleukin (IL-6) in the cellular area. In the results of the production of interleukin 10 (IL-10), no sample was effective in significantly increasing the content of this anti-inflammatory cytokine, demonstrating that this should not be the way in which these compounds act as anti-inflammatories.

Keyword: *Citrus*, Biotransformation, Inflammation, Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da sequência de sinalização intracelular por receptores Toll-like (TLRs).	19
Figura 2 Estrutura geral dos flavonoides e das suas diferentes classes.....	25
Figura 3. Estrutura geral dos ácidos fenólicos.....	27
Figura 4. A estrutura química principal dos estilbenos	27
Figura 5. A estrutura química principal das lignanas	28
Figura 6. As estruturas químicas dos taninos condensados e hidrolisáveis	29
Figura 7. Fluxograma geral das atividades realizadas na biotransformação e avaliação da bioatividade dos extratos fenólicos de resíduos de <i>citrus</i>	40
Figura 8. Porcentagem de viabilidade celular após exposição das amostras em relação ao controle de células sem tratamento (100% de viabilidade celular)	57
Figura 9.1. Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação de FT utilizando microplacas de 96 poços.....	106
Figura 9.2. Curva padrão de Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.....	106
Figura 9.3. Curva padrão de Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método ORAC.....	107
Figura 9.4. Curva padrão de óxido nítrico.....	104
Figura 9.5. Curva padrão de TNF- α com as amostras com diluição 1:4 sem LPS.....	104
Figura 9.6. Curva padrão de TNF- α com as amostras com diluição 1:50 com LPS.....	105
Figura 9.7. Curva padrão de IL-6 com as amostras sem diluição com e sem LPS.....	105
Figura 9.8. Curva padrão de IL-6 com as amostras com diluição 1:20 com e sem LPS.....	106
Figura 9.9. Curva padrão de IL-10 com as amostras sem diluição com e sem LPS.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal do Bagaço de <i>citrus</i> expressa em porcentagem (%) em base seca.	49
Tabela 2 – Conteúdo de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g AGE /mg}$ de amostra).	50
Tabela 3 – Atividade antioxidante pelo método DPPH ($\mu\text{mol Trolox Equiv. /mg}$ de amostra).	52
Tabela 4 – Atividade antioxidante pelo método ORAC ($\mu\text{mol Trolox Equiv. /mg}$ de amostra).	55
Tabela 5 – Concentração de óxido nítrico (NO) (pg/mL) no sobrenadante celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após a exposição das amostras	58
Tabela 6 – Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- α) (pg/mL) no sobrenadante de cultivo celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após a exposição das amostras	61
Tabela 7 – Concentração de interleucina 6 (IL-6) (pg/mL) no sobrenadante de cultivo celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após a exposição das amostras....	65
Tabela 8 – Concentração de interleucina 10 (IL-10) (pg/mL) no sobrenadante de cultivo celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após à exposição das amostras....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPH	Dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
CEIs	Células epiteliais intestinais
CH ₂ CL ₂	Diclorometano
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DII	Doença inflamatória intestinal
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
eNOS	Forma constitutiva da enzima sintase do óxido nítrico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FES	Fermentação em estado sólido
FL	Fluoresceína
FL	Fermentação líquida
FT	Fenólicos totais
FS	Fermentação submersa
GAE	<i>Galic Acid Equivalent</i> - Equivalente em Ácido Gálico
GLUT 4	Transportador de glicose
HES	Hesperidina
HG	Hesperetina 7-O-glucósido
ICAM -1	Molécula de adesão intercelular
IFN-gama	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-23	Interleucina 23
IROS	Intermediários reativos de oxigênio
iNOS	Forma induzível da enzima sintase do óxido nítrico
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i> – Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos-1
M-CSF	Receptor de colônias de macrófagos
MPO	Enzima mieloperoxidase

MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
NEO	Isômero neohesperidina
NF-κB	Fator nuclear-Kb
nNOS	Forma neuronal da enzima sintase do óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
ONOO-	Peroxinitrito
O ₂ -	Ânion superóxido
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> - Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
SOCS1	Supressor de sinalização
SOCS3	Supressor de sinalização
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i> - Receptor tool-like
TLR-4	<i>Toll-Like Receptor 4</i> - Receptor Toll-like 4
Trolox®	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromanol-2-ácido carboxílico
U.V.	Irradiação ultra-violeta
VCAM –1	Molécula de adesão celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Processos inflamatórios e doenças crônicas	18
3.2 Fator de necrose tumoral (TNF- α)	21
3.3 Interleucina 6 (IL-6).....	22
3.4 Interleucina 10 (IL-10).....	23
3.5 Óxido nítrico (NO).....	23
3.6 Polifenóis e ação anti-inflamatória	24
3.7 Efeitos anti-inflamatórios de polifenóis em ensaios celulares	32
3.8 Fenólicos de cítricos, sua biotransformação e atividade biológica.....	34
3.9 Caracterização das amostras biotransformadas	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material	39
4.2 Métodos	39
4.2.1 Composição centesimal do resíduo de <i>citrus</i>	40
4.2.2 Processos de Biotransformação dos fenólicos de resíduos de cítricos.....	41
4.2.2.1 Preparo do resíduo de <i>citrus</i> antes da biotransformação fermentativa.....	41
4.2.2.2 Microrganismo	41
4.2.2.3 Biotransformação (Processo fermentativo)	41
4.2.2.4 Preparo do resíduo de <i>citrus</i> antes da biotransformação enzimática.....	42
4.2.2.5 Biotransformação (Processo enzimático)	42
4.2.2.6 Extrato <i>in natura</i>	42
4.2.2.7 Atividade Enzimática	42
4.2.3 Caracterização dos Extratos Obtidos.....	43
4.3.3.1 Determinação de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu	43
4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos Extratos Obtidos	44
4.2.4.1 Ensaio de DPPH	44
4.2.4.2 Capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC	45

4.2.5 Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos obtidos em ensaios celulares	46
4.2.5.1 Cultura celular	46
4.2.5.2 Avaliação da ação citotóxica dos extratos.....	46
4.2.5.3 Ensaio de ação anti-inflamatória em Macrófagos	46
4.2.5.4 Óxido nítrico.....	47
5. ESTATÍSTICA.....	48
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Composição centesimal do bagaço de <i>citrus</i>	49
6.2 Compostos fenólicos totais (FT).....	49
6.3 Capacidade antioxidante - DPPH	52
6.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC	54
6.5 Viabilidade celular pelo ensaio MTT	56
6.6 Concentração de óxido nítrico (NO).....	57
6.7 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- α).....	60
6.8 Concentração de interleucina 6 (IL-6)	64
6.9 Concentração de interleucina 10 (IL-10)	69
7. CONCLUSÃO.....	73
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICES	106
APÊNDICE A: Curvas padrão empregadas nas análises de compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos.....	106
APÊNDICE B: Curva padrão dos mediadores inflamatórios: óxido nítrico, TNF- α , IL-6 e IL-10	108

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa desenvolvido pelo corpo a fim de combater infecções (originadas por vírus, bactérias ou outros patógenos) e também injúrias (cortes ou queimaduras) (REUTER *et al.*, 2010). Este processo é reconhecido como um tipo de resposta imunológica inespecífica e como parte da etiologia de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) para os humanos. Em 2012, as doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs) foram a causa da mortalidade de 38 milhões de pessoas no mundo, acometendo 68% da população. Dentre as DCNTs, diabetes, câncer e as doenças cardiovasculares são as mais recorrentes no mundo (WHO, 2014).

Estudos epidemiológicos têm apoiado a hipótese de que a ingestão de polifenóis na dieta tenha um papel benéfico em diversas doenças inflamatórias, pois esses compostos apresentam elevado potencial anti-inflamatório. Assim, uma dieta rica em compostos fenólicos parece estar associada com a redução do risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias como câncer e doenças cardiovasculares (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997; CESAR *et al.*, 2010).

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana. Entretanto, sua estrutura molecular pode afetar sua atividade antioxidante e a sua biodisponibilidade (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). A maioria desses compostos são encontrados em plantas na forma glicosilada, associados às moléculas de açúcares, polimerizados ou complexados com outras macromoléculas. Essa conjugação reduz sua capacidade antioxidante, pois as hidroxilas dos anéis fenólicos precisam estar disponíveis para estabilizar os radicais livres. A literatura indica que fenólicos agliconados, são mais bioativos (VATTEM e SHETTY, 2003). A forma aglicona também é mais biodisponível, apresentando-se pronta para a absorção no intestino delgado, ao contrário da sua forma glicosilada que deve sofrer hidrólise, o qual ocorre somente no cólon por microrganismos, reduzindo sua absorção (HOLLMAN e KATAN, 1997). Assim sendo, processos de biotransformação de fenólicos e sua adição na dieta têm se apresentado como alternativa atraente na busca por alimentos funcionais.

A idéia de utilizar compostos naturais, derivados de plantas, como os polifenóis, em processos inflamatórios é de interesse da população em geral. Dessa forma, é importante atingirmos uma compreensão da ação dos polifenóis em diferentes proporções do processo inflamatório: desde microscópio, como a ação nos órgãos como o intestino; e também nos mecanismos moleculares, como a regulação as citocinas e outros mediadores inflamatórios.

Além disso, pouco se compreende sobre quais as melhores formas de consumo desses fenólicos: purificados e isolados, ou como parte de uma matriz mais complexa, em extratos ricos que podem apresentar efeitos sinérgicos.

Uma fonte interessante de compostos fenólicos são as frutas cítricas. Dentre os produtores de frutas cítricas, o Brasil destaca-se por ser o maior produtor mundial de laranja. Em 2012 o Brasil atingiu a sua produção em cerca de 18 milhões de toneladas e, o estado de São Paulo foi o destaque com 74% de participação na produção nacional (INVESTE SÃO PAULO, 2013). Projeções do Ministério da Agricultura estimam crescimento de 0,89% na taxa anual de produção de laranja, alcançando uma produção de 20,5 milhões de toneladas na safra 2018/2019 (MAPA, 2015). Do total produzido no Brasil, estima-se que 85% seja destinado a indústria de suco e o restante ao consumo *in natura* (CONAB, 2013). Para a produção do suco de laranja, o principal subproduto gerado é o bagaço, composto por casca, polpa e semente, o qual compõe 50% do fruto (FIORENTIN *et al.*, 2010; DE MORAES CRIZEL *et al.*, 2013). Este bagaço é utilizado comumente como componente de ração animal (CARVALHO, 2015). Entretanto, sabe-se que a casca dos cítricos apresenta elevado conteúdo de polifenóis, e diversos estudos demonstram os efeitos positivos dos extratos da casca no tratamento das doenças crônicas não-transmissíveis (FUKUCHI *et al.*, 2008; JUNG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; DING *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012; RAASMAJA *et al.*, 2013).

Nesse sentido, este trabalho pretende avaliar e comparar o potencial biológico de dois extratos ricos em compostos fenólicos, extraídos de resíduos provenientes da indústria do suco de laranja e modificados um por via fermentativa e o outro enzimática, conforme estudado por Madeira *et al.* (2014). Estes extratos fenólicos de cítricos podem se tornar importantes ingredientes funcionais ou nutracêuticos, visto que possuem uma gama de compostos fenólicos bioativos, os quais possuem um grande potencial biológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório de extratos de resíduos de *citrus* biotransformados por via fermentativa e enzimática, em modelo *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar os processos de biotransformação enzimática e fermentativa dos resíduos.
- Caracterizar os extratos obtidos pelo teor de fenólicos totais.
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos utilizando os ensaios *in vitro* DPPH e ORAC
- Avaliar o efeito dos extratos na modulação da produção do óxido nítrico em cultura de células de Macrófagos de murinos estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS).
- Avaliar o efeito dos extratos na modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) em cultura de células de Macrófagos de murinos estimuladas com LPS.
- Avaliar o efeito dos extratos na modulação da secreção de citocina anti-inflamatória (IL-10) em cultura de células de Macrófagos de murinos estimuladas com LPS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processos inflamatórios e doenças crônicas

O processo inflamatório inicial é caracterizado pelo aumento da permeabilidade do tecido endotelial e influxo de leucócitos para o interstício, ocasionando o edema. Esse processo é considerado natural quando ocorre uma lesão tecidual (GABOR, 1979). A persistência por períodos maiores dessa inflamação considerada “normal” pode gerar a inflamação crônica que é prejudicial ao organismo porque acarreta uma produção de respostas fisiológicas anormais, aumentando o risco de danos celulares e por consequência o desenvolvimento de doenças crônicas (REUTER *et al.*, 2010).

O desencadeamento dessa resposta inflamatória deve-se à ação dos receptores *Toll-like* (TLRs) que são encontrados em diferentes tipos de células, incluindo as de defesa como os macrófagos (WRIGHT *et al.*, 1990; POLTORAK *et al.*, 1998; MILLER, ERNST e BADER, 2005). Esses macrófagos são encontrados inicialmente como monócitos circulando na corrente sanguínea, os quais têm uma vida relativamente curta, pois no momento em que penetram nos tecidos, são diferenciados em macrófagos (SUNDERKOTTER *et al.*, 2004). Os macrófagos são essenciais para a defesa do organismo, pois modulam a resposta inflamatória e a homeostase celular, visto que suas principais funções são fagocitose e endocitose de patógenos (MANTOVANI *et al.*, 2004)

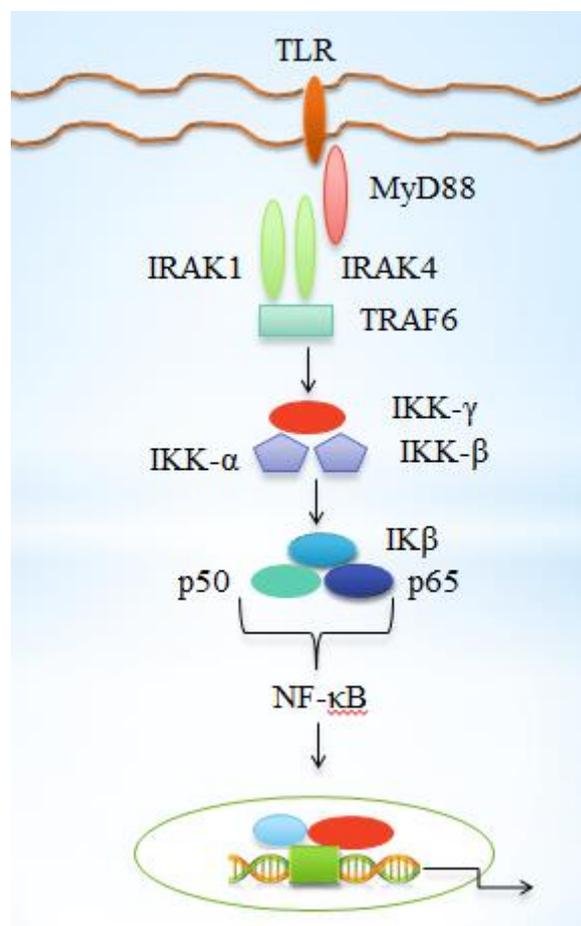
Os TLRs exercem função importante na resposta imune do organismo quando expostos a patógenos, pois cada receptor detecta estruturas distintas dos mesmos, como por exemplo, o *Toll-like* 4 (TLR4) reconhece lipopolissacarídeos (LPS) (KAWAI e AKIRA, 2011). Os TLR4 ligam-se aos LPS da parede celular de bactérias gram negativas, ativando o fator nuclear- κ B (NF- κ B) no interior do citoplasma do macrófago (HART *et al.*, 2005; LU, YEH e OHACHI, 2008). NF- κ B é um grupamento de proteínas composto por cinco membros denominados RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF-KB1, um precursor de p50) e p100 (NF-B2, um precursor de p52), os quais regulam a expressão de genes relacionados a imunidade inata, adaptativa, inflamação, proliferação e respostas ao stress (KARIN e GRETEN, 2005; GILMORE, 2006). A ativação do NF- κ B inicia uma cascata de reações ligadas a respostas inflamatórias que culminam com a liberação de citocinas inflamatórias como a IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (HART *et al.*, 2005; LU, YEH e OHACHI, 2008).

O NF- κ B, quando não ativado, encontra-se no citoplasma acoplado a uma proteína inibitória chamada I κ B. Para que ocorra a liberação do fator nuclear e ele se desloque

para o núcleo, o I κ B precisa sofrer reações de fosforilação e degradação (BAUERLE e BALTIMORE, 1996; BALDWIN, 1996). A interação do NF- κ B com o núcleo interfere no aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e a proliferação celular de macrófagos (HART *et al.*, 2005; LU, YEH e OHACHI, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2014).

A Figura 1 mostra uma representação esquemática da sequência de sinalização intracelular por receptores *Toll-like* (TLRs).

Figura 1 – Representação esquemática da sequência de sinalização intracelular por receptores *Toll-like* (TLRs).



Fonte: Adaptado de Miller, Ernst e Bader (2005).

Os processos inflamatórios nos tecidos adiposos têm sido considerados responsáveis pelas complicações em longo prazo da obesidade a saúde. A expressão de uma gama de citocinas é uma característica central do processo inflamatório na obesidade (O'ROURKE, 2009). O tecido adiposo secreta uma quimiocina denominada proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), a qual está relacionada com a infiltração de macrófagos no tecido (JIAO *et al.*, 2009). A secreção da MCP-1 recruta monócitos que se

diferenciam em macrófagos de fenótipos M1 ou Th1 que se acumulam no tecido adiposo. Os macrófagos possuem dois fenótipos diferentes, o primeiro é denominado M1 ou Th1, e é caracterizado por alta capacidade de apresentação de antígenos, elevada secreção de IL-12 e IL-23, alta produção de intermediários tóxicos como óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio (IROS) (BONNOTTE *et al.*, 2001) A indução da diferenciação do macrófago no fenótipo M1 é normalmente gerada por interferon gama (IFN-gama), LPS e/ou fator de necrose tumoral (TNF- α) (MYTAR *et al.*, 1999). Os macrófagos M2 ou Th2 possuem níveis reduzidos de citocinas inflamatórias e secretam grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (TAYLOR *et al.*, 2005). A indução do M2 é normalmente gerada por IL-3 e IL-4 (MYTAR *et al.*, 1999; BONNOTTE *et al.*, 2001).

Com o acúmulo de M1 ou Th1 no tecido adiposo, inicia-se a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas células (KAMEI *et al.*, 2006; WEISBERG *et al.*, 2006; KRAAKMAN *et al.*, 2014). Além disso, a expansão rápida do tecido adiposo (no caso de um ganho de peso acelerado) provoca um aumento do tamanho dos adipócitos existentes, acarretando uma vascularização insuficiente no local, que resulta em uma baixa oxigenação do tecido (BALISTRERI, CARUSO e CANDORE, 2010). Nesse processo, macrófagos infiltram no local aumentando a secreção de substâncias pró-inflamatórias (WEISBERG *et al.*, 2003; RAMALHO e GUIMARÃES, 2008). Portanto, a regulação da infiltração de macrófagos na obesidade é uma estratégia importante para a interrupção do avanço da doença (YOSHIDA *et al.*, 2014).

O fator de necrose tumoral elevado na obesidade induz também a resistência insulínica em uma ampla variedade de células, através de vários mecanismos, como a inibição da expressão do transportador de glicose (GLUT 4) (O'ROURKE, 2009). Assim, pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) apresentam concentrações plasmáticas elevadas do TNF- α e também da interleucina 6. O aumento desses mediadores inflamatórios origina uma associação entre inflamação e DM2 (SCHMIDT *et al.*, 1999).

A doença inflamatória intestinal (DII) também se caracteriza por ser uma inflamação crônica com produção desequilibrada de citocinas pró-inflamatórias. A colite ulcerativa e a doença de Cronh são as suas principais formas (ORDÁS *et al.*, 2012). Os mecanismos dessas doenças são controlados pelas células epiteliais intestinais (CEIs), que podem iniciar o processo inflamatório através da sua capacidade de sintetizar e liberar mediadores inflamatórios. As CEIs também são responsáveis pela regulação da permeabilidade epitelial e controle da exposição de células imunitárias aos antígenos. Além disso, também respondem aos mediadores inflamatórios, podendo aumentar ou diminuir o

processo inflamatório (JUNG *et al.*, 1995; PANJA *et al.*, 1998; BRUEWER *et al.*, 2005, WALLE *et al.*, 2010). Durante o processo de inflamação intestinal, monócitos migram da corrente sanguínea para a região da mucosa inflamada e, em seguida, se diferenciam em macrófagos. Essas células de defesa ficam nessa região inflamada liberando mediadores inflamatórios (MACDERMOTT, 1996).

Pelo fato do TNF- α e das citocinas pró-inflamatórias serem importantes na manutenção dos estados inflamatórios crônicos, torna-se interessante a investigação de fatores da dieta que possam ativar mecanismos regulatórios que inibem a produção do TNF- α e dessas citocinas. Os modelos com macrófagos são pertinentes para esse tipo de investigação por serem células diretamente envolvidas nos processos inflamatórios em diversos tecidos.

3.2 Fator de necrose tumoral (TNF- α)

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é liberado em resposta às endotoxinas e de bactérias gram-negativas. Ele é considerado o principal mediador envolvido na fisiopatologia da sepse produzida por essas bactérias (BEUTLER e CERAMI, 1987; TRACEY *et al.*, 1987). É sintetizado por uma gama de células imunitárias como linfócitos T, mastócitos, macrófagos e células natural “killer” (BEUTLER e CERAMI, 1987; BEUTLER e CERAMI, 1988; KUTTEH *et al.*, 1991). Existem dois tipos de receptores do TNF- α : TNFR1 expresso em quase todas as células e o TNFR2 que é expresso em oligodendrócitos, células T, células endoteliais e nas células estaminais mesenquimais humanas (YELAVARTHI e HUNT, 1993; GRELL *et al.*, 1995; FAUSTMAN e DAVIS, 2010; NAKAZAWA *et al.*, 2011).

A ligação do TNF- α com seus receptores pode resultar em apoptose e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (WAJANT, PFIZENMAIER e SCHEURICH, 2003). O TNFR1 contém um domínio de interação proteína-proteína, denominado domínio de morte (DM) (TARTAGLIA *et al.*, 1993). Este domínio, quando ativado, ocasiona a apoptose celular (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998). Em relação à produção de outras citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α , como uma variedade de outros indutores, pode estimular a degradação proteolítica de I κ B pelo proteassoma, libertando o NF- κ B e permitindo que ele se desloque para o núcleo. A interação desse fator com o núcleo induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (PERKINS, 2000).

O TNF- α também é responsável pela indução da síntese de proteína C reativa, aumento da permeabilidade vascular e com isso, maior recrutamento de células inflamatórias (GRIFFIN *et al.*, 2012). Por isso, o controle da expressão do TNF- α é importante, pois ele é o

principal mediador das respostas inflamatórias e sua super-expressão pode acarretar em inflamações crônicas.

3.3 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina que pode ser produzida por uma variedade de células como linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos, células endoteliais, células mesangiais e algumas células tumorais. A sua produção pode ser induzida por outras citocinas, como IL-1, fator de necrose tumoral (TNF- α), bem como infecções bacterianas e virais (ATAIE-KACHOIE, POURGHOLAMI e MORRIS, 2013). A IL-6 também é secretada por macrófagos quando eles são ativados por lipopolissacarídeos (ADAMS e HAMILTON, 1984; MORRISON e RYAN, 1987).

A IL-6 transmite seu sinal quando ligada ao receptor IL6R (denominado também como CD26) e ao componente transdutor de sinal gp30 (também denominado CD130). Existem dois tipos de IL6R, o receptor de membrana celular (IL-6RA) que forma um complexo com o gp30, após se ligar com o IL-6. Este é o tipo de sinalização clássica. O outro é um receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R), que se liga à IL-6 e, em seguida, se une ao receptor de membrana B cadeia-gp130 levando à transdução de sinal. Este tipo é denominado de trans-sinalização (JONES *et al.*, 2001; ATAIE-KACHOIE, POURGHOLAMI e MORRIS, 2013).

Essa citocina regula vários processos fisiológicos, incluindo a produção de proteínas de fase aguda no fígado, a inflamação, a resposta imunitária, o mecanismo de defesa do hospedeiro e o crescimento celular (KISHIMOTO, 2006). Ela é responsável também pela produção de outros mediadores inflamatórios, tais como outras citocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (WOODFIN, VOISIN e NOURSHARGH, 2010). Além de regular a ativação de células B e diferenciação de células T (NEURATH e FINOTTO, 2011). Uma vez que ela facilita o recrutamento de monócitos para a região inflamada, essa citocina é a principal responsável por perpetuar a inflamação aguda induzindo a inflamação crônica. Além de aumentar a infiltração de leucócitos, através do aumento da expressão de moléculas de adesão, tais como molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 e molécula de adesão celular vascular (VCAM) -1 em células endoteliais (CHEN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006). Outra função importante do IL-6 na inflamação é a participação na diferenciação de monócitos para macrófagos, por induzir a expressão do receptor de colônias de macrófagos (M-CSF) (CHOMARAT *et al.*, 2000).

3.4 Interleucina 10 (IL-10)

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que suprime a inflamação causada por agentes patogênicos (SARAIVA e O'GARRA, 2010; POT, APETOH e KUCHROO, 2011). As células responsáveis por produzir IL-10 são os monócitos/macrófagos, células B, células T e diversos subconjuntos de células T reguladoras, CD4+ e CD8+ (MAYNARD e WEAVER, 2008; HEDRICH e BREM, 2010).

A atividade da IL-10 é mediada por um receptor complexo de superfície celular. Este receptor possui duas cadeias diferentes, a IL-10R1 e IL-10R2. A interação de IL-10 / IL-10R1 altera a conformação da citocina, permitindo a associação do complexo IL-10 / IL-10R1, com a IL-10R2 (MOORE *et al.*, 2001). A IL-10 quando se liga com as duas cadeias do receptor, induz a ativação da JAK1 (associada com IL-10R1) e tirosina-quinase (TyK2) (associada com a IL-10R2), que juntos, induzem a fosforilação IL-10R1, permitindo a ligação e fosforilação de fatores de transcrição como o STAT3, ou STAT1 e STAT5 em alguns tipos de células (FINBLOOM e WINESTOCK, 1995; WEBER-NORDT *et al.*, 1996; WEHINGER *et al.*, 1996). STAT3 migra para o núcleo celular e/ou já está presente no núcleo, mas sofre uma mudança na sua conformação para induzir a transcrição de genes correspondentes às proteínas efetoras, como a IL-10 (SABAT *et al.*, 2010).

A IL-10 possui um efeito anti-inflamatório por impedir a maturação de células apresentadoras de antígenos e por inibir a produção de citocinas pró- inflamatórias (MOORE *et al.*, 2001; SARAIVA e O'GARRA, 2010; POT, APETOH e KUCHROO, 2011). Essa interleucina pode inibir a produção de citocinas por inativar as células T CD4 + em determinadas condições *in vitro* (CAUX *et al.*, 1994; GROUX *et al.*, 1998). Essa inativação inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-2, IL-5, IFN- γ e TNF α (GROUX *et al.*, 1998). Além disso, a sinalização de IL-10 induz a produção de supressores de sinalização chamados, SOCS1 e SOCS3, que também suprimem a produção de citocinas pró inflamatórias (YOSHIMURA, NAKA e KUBO, 2007). Consequentemente, a IL-10 reduz o processo inflamatório. Além disso, em alguns estudos *in vivo*, houve um aumento da capacidade migratória dos macrófagos na ausência de IL-10 (ZIGMOND *et al.*, 2014).

3.5 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é um gás de curta duração difundido pelas células e é reconhecido por ser um dos fatores que regulam a morte apoptótica e a viabilidade celular (EU *et al.*, 2000;

JAFFREY *et al.*, 2001). O óxido nítrico influencia na viabilidade celular porque é capaz de competir com o oxigênio pelos sítios de ligações com substratos em vias bioenergéticas. Além de formar complexos com grupos heme e ferro-enxofre existente em muitas proteínas mitocondriais, afetando a atividade catalítica celular. Ele também diminui o potencial da membrana interna da mitocôndria, que são os primeiros passos na via apoptótica celular (HORTELANO *et al.*, 1997; BOSSY-WETZEL, NEWMAYER e GREEN, 1998; HORTELANO, ALVAREZ e BOSCÁ, 1999; RADI *et al.*, 2002; BROWN e BORUTAITE, 2002; BOVERIS, ALVAREZ e NAVARRO, 2002; BROOKES *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2003).

Nos mamíferos, existem três isoformas de enzimas sintases que são responsáveis pela produção de óxido nítrico. Essas enzimas são denominadas como NOS I ou nNOS, a forma neuronal, NOS II-induzível, presente em vários tipos de células mediante à estímulos inflamatórios e NOS III (eNOS) ou enzima constitutiva, presente principalmente no endotélio (MICHEL e FERON, 1997; WEST *et al.*, 2001; IGNARRO, 2002).

O eNOS é responsável por impedir leucócitos e plaquetas de aderirem à parede vascular e pela manutenção do tônus vascular baixo. O nNOS é um neuromodulador ou neuromediador em terminações nervosas e, o iNOS desempenha funções na resposta inflamatória (MICHEL e FERON, 1997).

A produção de NO derivado da iNOS pode ser iniciada por citocinas inflamatórias como a IFN- γ , TNF- α ou IL-1 (HEBA *et al.*, 2001). Além disso, o reconhecimento do LPS por macrófagos conduz a ativação do NF- κ B, que é responsável pela transcrição de iNOS (XIE e NATHAN, 1994; MATSUNO *et al.*, 1998).

O “NO inflamatório” é formado junto com grandes quantidades de ânion superóxido (O_2^-) e, no momento que os dois entram em contato formam o peroxinitrito ($ONOO^-$) (GUZIC *et al.*, 2002). Este possui efeito citotóxico, como a inibição da respiração mitocondrial (ISCHIROPOULOS e AL-MEHDI, 1995).

3.6 Polifenóis e ação anti-inflamatória

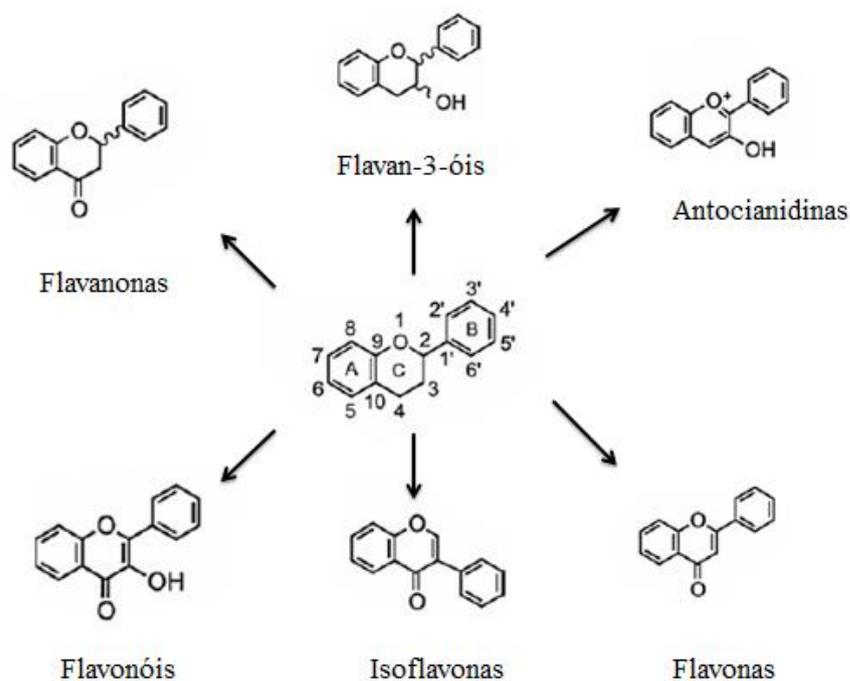
Compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que apresentam no mínimo um anel aromático em sua estrutura ligada a uma ou mais hidroxilas (BRAVO, 1998). Eles são classificados de acordo com o número de anéis aromáticos e com o tipo de elemento estrutural que unem estes anéis entre si (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Os polifenóis são originados do metabolismo secundário em plantas (TREUTTER, 2001). Eles participam da reprodução e crescimento de vegetais, contribuem para a pigmentação de flores e frutos, atuam na proteção contra predadores e da irradiação ultravioleta (U.V.) (MARTINS *et al.*, 2011; SOTO *et al.*, 2011; LIU, 2013). Além de suas importantes funções nas plantas, fenólicos apresentam uma gama de propriedades benéficas para a nossa saúde, como proteção das células contra o estresse oxidativo e redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas (LIU, 2013). Os polifenóis também são considerados antioxidantes naturais e representam um importante grupo de compostos bioativos em alimentos (DUEÑAS *et al.*, 2005). Os antioxidantes protegem o organismo de diferentes maneiras tais como: evitando a formação de radicais livres, reparando as lesões causadas por estes radicais e previnem a perda da integridade celular (GARCIA-ALONSO *et al.*, 2004).

Os polifenóis são divididos entre os seguintes grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e taninos (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Na classe dos flavonoides encontram-se as seguintes subclasses: flavonoides, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). A Figura 2 apresenta a estrutura geral dos flavonoides e das suas diferentes classes.

Figura 2 – Estrutura geral dos flavonoides e das suas diferentes classes.



Fonte: Adaptado de Del Rio *et al.* (2013).

Os flavonoides são compostos abundantes no reino vegetal, de baixo peso molecular, formados por dois anéis benzênicos com pontes de três carbonos condensadas em um oxigênio, formando um anel intermediário (DILLARD e GERMAN, 2000; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; ANGELO e JORGE, 2007).

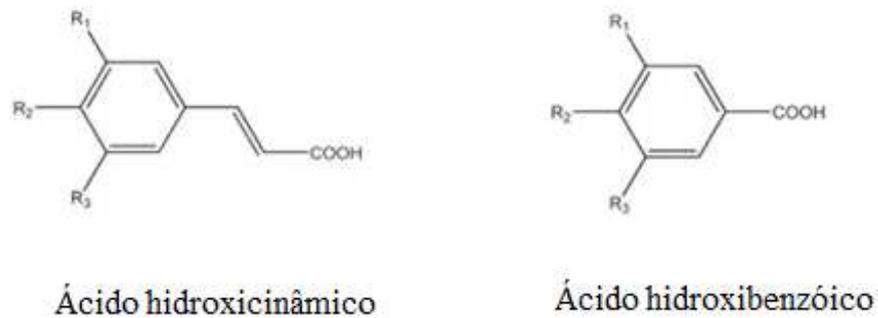
Os flavonóis possuem uma ligação dupla entre os carbonos C₂ e o C₃ com um grupo hidroxila na posição C₃, são a subclasse dos flavonoides mais presentes nos alimentos, tendo a quercetina como o composto mais representativo. As flavonas caracterizam-se por possuírem uma ligação dupla entre os carbonos C₂ e o C₃ e são os compostos menos comuns entre os flavonoides (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Flavanonas são caracterizadas pela existência de uma cadeia de três carbonos saturadas e um oxigênio no C₄. Geralmente são glicosiladas por um dissacarídeo em C₇. As principais formas agliconas são naringenina e hesperetina (IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

As isoflavonas são compostos com estruturas semelhantes às do estrogênio, com grupos hidroxilo em C₇ e C₄, como a molécula de estradiol. Essas moléculas possuem características benéficas para o organismo, por isso tem sido sugerido o seu uso na prevenção ou tratamento de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Alguns efeitos fisiológicos são associados à sua semelhança estrutural com p-estradióis (KLEJDUS *et al.*, 2007; D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

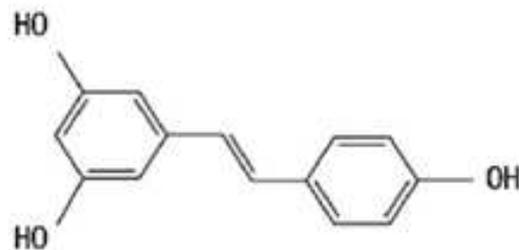
As antocianinas são compostos solúveis em água que podem aparecer na cor vermelho, roxo ou azul, dependendo do pH do meio (IGNAT, VOLF e POPA, 2011). As antocianidinas, formas agliconadas das antocianinas, consistem em um anel aromático A ligado a um anel heterocíclico C que contém oxigênio, que também é ligado por uma ligação carbono-carbono com um terceiro anel aromático B (KONCZAK e ZHANG, 2004). As antocianidinas quando encontradas na sua forma glicosídica, são conhecidas como antocianinas (IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

Os ácidos fenólicos podem ser encontrados nas plantas tanto em sua forma livre como conjugada (ROBBINS, 2003). Eles são divididos em dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos possuem em comum a estrutura C₆-C₁ e, entre eles, encontra-se o ácido gálico. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem em sua estrutura compostos aromáticos com uma cadeia de carbono de três lados (C₆-C₃) e, entre eles, encontram-se o caféico e o ferúlico (BRAVO, 1998). A Figura 3 apresenta a estrutura geral dos ácidos fenólicos.

Figura 3 – Estrutura geral dos ácidos fenólicos

Fonte: Adaptado de Shahidi e Ambigaipalan (2015)

Estilbenos, em particular o trans-resveratrol e os seus glucosídeos, possuem potencial antioxidante, anticancerígeno e propriedades anti-tumorais (BURNS *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2009; TORRES *et al.*, 2010). Esses compostos são localizados principalmente em uvas, bagas e amendoins (IGNAT, VOLF e POPA, 2011). A Figura 4 apresenta a estrutura química principal dos estilbenos.

Figura 4 – A estrutura química principal dos estilbenos

Resveratrol

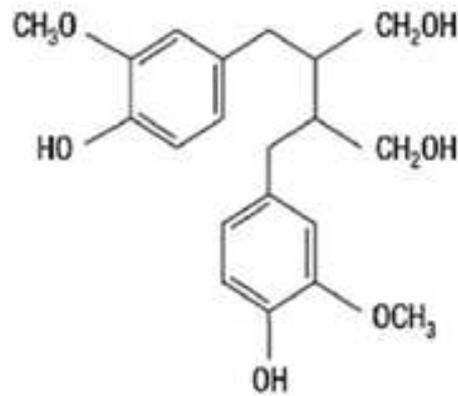
Estilbenos

Fonte: Adaptado de Ignat, Volf e Popa (2011)

As lignanas estão presentes na natureza, em sua maioria, na sua forma livre. Apesar da sua estrutura de base ser composta apenas por duas unidades de fenilpropano (C₆ – C₃), lignanas apresentam uma vasta diversidade estrutural. As lignanas e seus derivados tem

demonstrado um efeito benéfico na quimioterapia e em alguns outros fármacos. Isto contribui para o aumento do interesse nos estudos destes compostos (SALEEM *et al.*, 2005). A Figura 5 apresenta a estrutura química principal das lignanas.

Figura 5 – A estrutura química principal das lignanas

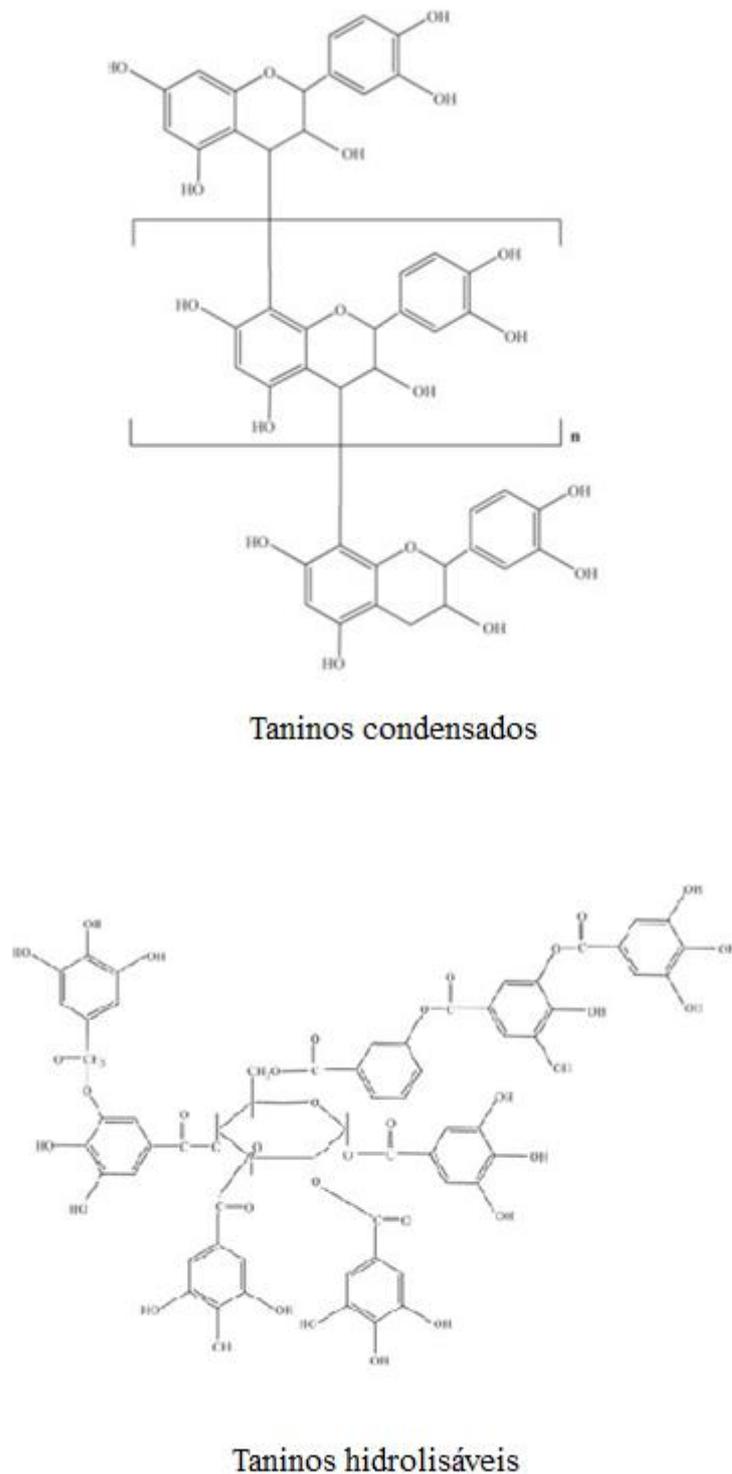


Lignanas

Fonte: Adaptado de Ignat, Volf e Popa (2011)

Os Taninos podem ser subdivididos em taninos condensados e hidrolisáveis (SHAHIDI e NACZK, 2004). Os taninos condensados são polímeros de flavonóides, enquanto que os taninos hidrolisáveis são ácidos gálicos glicosilados (FERREIRA e SLADE, 2002; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Os grupos fenólicos dos taninos se ligam fortemente com o NH de peptídeos e proteínas, isto impede a sua hidrólise e digestão no estômago. Por este fato, são conhecidos como compostos antinutricionais na natureza (SHAHIDI e NACZK, 2004). A Figura 6 apresenta as estruturas químicas dos taninos condensados e hidrolisáveis.

Figura 6 – As estruturas químicas dos taninos condensados e hidrolisáveis



Fonte: Adaptado de Shahidi e Ambigaipalan (2015)

Uma preocupação em relação ao consumo de fenólicos era o fato de serem associados como fatores antinutricionais, visto que reduziam a digestibilidade de proteínas, quer por precipitação das mesmas ou por inibição da atividade enzimática (FERGUSON,

2001). Os taninos são compostos que podem ser considerados exemplos destes fatores, pois como explicado no texto anteriormente complexam-se com proteínas, bem como com enzimas (NACZK *et al.*, 1996; NAURATO *et al.*, 1999). Além disso, taninos podem inibir a absorção de minerais como o ferro e o cobre (REDDY e COOK, 1991; SAMMAN *et al.*, 2001).

Entretanto, apesar destas propriedades antinutricionais, os taninos possuem uma gama de atividades biológicas benéficas para a saúde, tais como a inibição da oxidação lipídica e da progressão de tumores (OKUDA, YOSHIDA e HATANO, 1992; HIGDON e FREI, 2003; OKUDA, 2005; NAGLE, FERREIRA e ZHOU, 2006). Por possuir estas propriedades anti-inflamatórias e anti-mutagênicas, além da elevada antioxidante, a preocupação que existia com os taninos foi substituída por um interesse em suas características bioativas (BRAVO, 1998).

As propriedades biológicas dos polifenóis dependem da sua biodisponibilidade (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). A biodisponibilidade dos compostos fenólicos é definida como a fração de polifenóis disponível para absorção e metabolismo pelos tecidos (RODRÍGUEZ-ROQUE *et al.*, 2014). Um dos fatores que modificam a biodisponibilidade dos polifenóis é a forma como eles se apresentam na natureza (NAKAJIMA, MACEDO e MACEDO, 2014). Os compostos fenólicos podem ser encontrados tanto em sua forma livre (agliconas), como ligados a açúcares (glicosídeos) e/ou proteínas (BRAVO, 1998).

As formas agliconas podem ser absorvidas diretamente no intestino delgado. Entretanto, a maioria dos polifenóis encontram-se presentes nos alimentos na forma esterificada, glicosilada ou ligada por outros polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma nativa. Estes compostos devem sofrer o processo de hidrólise por enzimas, que estão presentes em células da mucosa gastrintestinal como a β -glucosidase, ou pela microflora colônica, para então serem absorvidos (DAY *et al.*, 1998; NÉMETH *et al.*, 2003).

A prova indireta da absorção destes compostos através da barreira intestinal é a avaliação da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos em polifenóis (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). Isto tem sido observado para uma grande variedade de produtos alimentares, tais como o chá (SERAFINI, GHISELLI e FERRO-LUZZI, 1996; VAN HET HOF *et al.*, 1997) e o vinho tinto (MAXWELL, CRUICKSHANK e THORPE, 1994; FUHRMAN, LAVY e AVIRAM, 1995; SERAFINI, MAIANI e FERRO-LUZZI, 1998). Evidências diretas da absorção dos fenólicos podem ser baseadas na avaliação da concentração dos compostos no plasma e na urina, após a ingestão dos compostos puros ou

de produtos alimentares com conteúdos conhecidos destes fenólicos (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Muitos estudos estão focados nas funções antioxidantes e anti-inflamatórias dos compostos fenólicos. O efeito inibitório desses compostos na ativação das vias moduladas pelo NF- κ B é um dos mais estudados.

A daidzeína é um composto fenólico presente na soja sob a forma agliconada. Recentemente, foi relatado que este polifenol possui uma gama de efeitos benéficos para a saúde humana, atuando na prevenção do câncer, redução do risco de doenças cardiovasculares e neuroproteção de acidente vascular cerebral (GARDNER *et al.*, 2009; MANN *et al.*, 2009; SCHREIHOFFER e REDMOND, 2009). Kim *et al.* (2009) investigaram então o efeito da daidzeína na ativação do NF- κ B em animais com lesões do miocárdio. A análise do complexo NF- κ B foi realizada por Western blotting e as concentrações das citocinas TNF- α e IL-6 foram medidas por Kits ELISA. Para avaliar a infiltração de neutrófilos, os pesquisadores analisaram a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A daidzeína inibiu a translocação nuclear de NF- κ B, suprimiu a produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, diminuiu a infiltração de neutrófilos para as áreas isquêmicas, reduzindo o processo inflamatório. Os autores concluíram que estes foram os mecanismos de proteção do miocárdio realizados pelo polifenol que podem ser utilizados como terapia em que a ativação do NF- κ B é a sua principal causa.

Martín *et al.* (2006) investigaram os efeitos do resveratrol na inflamação crônica em um modelo de colite induzida pela administração intracolônica de TNBS em ratos Wistar. Os autores utilizaram a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) como um marcador de infiltração de neutrófilos e observaram que houve uma redução de sua atividade com o tratamento do resveratrol. Os pesquisadores verificaram por Western blotting que houve também uma redução do complexo proteico NF- κ B nos animais tratados com o resveratrol. Assim, eles relatam que um dos mecanismos possíveis de proteção do resveratrol envolve uma redução de infiltração dos neutrófilos na mucosa do cólon, através da inibição da ativação da via do NF- κ B. Foram medidos também níveis de PGE₂ e de PGD₂ conforme metodologia estabelecida por Martín *et al.* (2003). A concentração da citocina TNF- α foi analisada por kit ELISA. Neste estudo, os autores observaram que com o tratamento do resveratrol os valores de PGE₂ aumentaram mas retornaram aos valores basais, enquanto que o fenólico não modificou a concentração de PGD₂. Também foi observado que a concentração de TNF- α foi significativamente reduzida em animais tratados com o fenólico. Os autores concluíram que o resveratrol exerceu efeitos protetores na colite experimental

crônica, sugerindo que o fenólico pode ser utilizado no tratamento de doenças crônicas intestinais.

3.7 Efeitos anti-inflamatórios de polifenóis em ensaios celulares

Estudos *in vitro* auxiliam o entendimento do mecanismo de ação dos fenólicos e na avaliação do potencial anti-inflamatório de extratos naturais ou modificados em células isoladas. Portanto, servem como ponto de partida para pesquisas científicas em outros níveis de complexidade dos organismos, como animais e humanos (NAKAJIMA, MACEDO e MACEDO, 2014). Alguns estudos recentes que visaram observar os efeitos de compostos fenólicos de alimentos em processos inflamatórios com modelos *in vitro* estão revisados a seguir.

Kang *et al.* (2011) isolaram flavonoides de uma variedade de *citrus* da Coreia e estudaram a sua influência na supressão de respostas inflamatórias de células Raw 264,7, que sofreram estímulo inflamatório por LPS. Os autores verificaram por Western blotting que os flavonoides isolados inibiram a fosforilação e degradação de I κ B- α , após a estimulação da inflamação por LPS, bloqueando a translocação do NF- κ B para o núcleo. Foi realizado também o PCR-RT para análise de ARNm de IL-6, TNF- α , COX-2 e iNOS. Os pesquisadores observaram que os flavonoides isolados reduziram a expressão das proteínas analisadas.

Ha *et al.* (2012) investigaram a influência da narirutina, fração glicosilada derivada de cascas de *citrus*, na inflamação induzida por LPS de células RAW 264,7. Os autores analisaram a fosforilação e degradação da I κ B- α através da análise Western blotting, e com isso avaliaram se houve translocação nuclear de NF- κ B. Eles verificaram que houve inibição da degradação da I κ B- α e menor translocação nuclear de NF- κ B. Consequentemente, ocorreu a inibição da transcrição de citocinas inflamatórias e a redução da inflamação. Além disso, os pesquisadores avaliaram o nível de produção de óxido nítrico por meio da reação com o reagente de Griess, as concentrações de IL-1 β e TNF- α nos sobrenadantes celulares foram medidas por kits ELISA e a concentração de PGE₂ foi mensurada por imunoenensaio com enzima competitiva. Como resultado, as concentrações de óxido nítrico, PGE₂, IL-1 β e TNF- α foram significativamente reduzidas através do tratamento com as frações de narirutina.

Kao, Huang e Che (2012) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios de compostos funcionais de seis extratos do vegetal *Luffa cylindrica* em um ensaio *in vitro* com células de macrófagos RAW 264,7, que sofreram indução de inflamação por LPS. Entre os compostos bioativos analisados encontram-se os polifenóis, os carotenóides, as clorofilas e os

flavonoides. Os autores avaliaram as concentrações das proteínas associadas com a inflamação, tais como iNOS, COX-2 e I κ B- α por Western blotting. As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram analisadas por kits ELISA e as concentrações de prostaglandinas foram medidas pelo kit EIA. Eles mensuraram também a concentração de óxido nítrico por reações com o reagente de Griess. Ao considerar todos os resultados do estudo quando os autores compararam os seis extratos da *Luffa*, eles observaram que a redução na inflamação foi mais eficaz nos extratos da casca, especialmente no extrato de acetato de etilo da casca.

Hirai *et al.* (2007) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios dos fenólicos naringenina calcona, naringenina e rutina em um ensaio *in vitro* com células de macrófagos RAW 264,7, que sofreram indução de inflamação por LPS. Esses fenólicos são encontrados no tomate, acumulados quase que exclusivamente na casca. Para verificar a ação anti-inflamatória desses fenólicos, os autores investigaram se houve uma inibição da degradação do I κ B- α por Western blotting, que conduz a ativação do NF- κ B. Os pesquisadores observaram que o tratamento com naringenina e com a naringenina calcona suprimiram a degradação de I κ B- α , entretanto o tratamento com a rutina não manifestou qualquer efeito em relação à esse parâmetro. A concentração de óxido nítrico também foi medida através do reagente de Griess e as proteínas MCP-1 e TNF- α foram analisadas por kits ELISA. Em relação ao óxido nítrico, MCP-1 e TNF- α , os fenólicos naringenina e naringenina calcona inibiram significativamente a concentração destes mediadores inflamatórios analisados, enquanto que a rutina não mostrou afetar a produção dos mesmos.

Pan, Lin-Shiau e Lin (2000) estudaram os efeitos da curcumina e dos seus metabólitos: tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina, e octahidrocurcumina na inibição da proteína iNOS e na ativação do NF- κ B em macrófagos estimulados por LPS. A análise da proteína iNOS foi realizada por Western blotting e o ARNm da proteína foi mensurado por Northern blotting. Os autores verificaram que a curcumina teve um maior efeito na inibição da proteína iNOS que os seus metabólitos no ensaio de Western blotting e eles confirmaram isto pela redução de ARNm de iNOS por Northern blotting. Para determinarem a influência da curcumina sobre a translocação do NF- κ B para o núcleo, os pesquisadores examinaram a fosforilação e degradação I κ B- α através da avaliação da concentração desta proteína por análise de imunotransferência. A curcumina mostrou possuir uma forte capacidade em inibir a fosforilação e degradação do I κ B- α , com isso uma menor habilidade de translocação do NF- κ B para o núcleo.

3.8 Fenólicos de cítricos, sua biotransformação e atividade biológica

A biotransformação é um conjunto de modificações químicas catalisadas por sistemas biológicos, os quais podem ser realizados por enzimas, pela atividade enzimática, ou por microrganismos, através do processo de fermentação (MARTINS *et al.*, 2011; BANERJEE, SINGH e RAHMAN, 2012).

A hidrólise de um fenólico glicosilado em aglicona é um exemplo que pode ser realizado através da biotransformação enzimática. Enzimas como pectinases, celulases, amilases, hemicelulases e glucanases desempenham papel crucial na desintegração da matriz da parede celular da planta e, por conseguinte, maior liberação do polifenol (LANDBO e MEYER, 2001; STALIKAS, 2007; ZHENG, HWANG e CHUNG, 2009). Outra enzima que está sendo estudada no processo de biotransformação de fenólicos é a tanase. A enzima tanino acil hidrolase, nomeada como tanase (EC: 3.1.1.20) é uma enzima que pode ser sintetizada por fungos, bactérias e leveduras, na presença de ácido tânico (BELMARES *et al.*, 2004; AGUILAR *et al.*, 2007). Ela é capaz de modificar o perfil fenólico do extrato por liberar polifenóis complexos das paredes celulares que formam a matriz (CHAMORRO *et al.*, 2012).

Outro processo de biotransformação é a fermentação, que pode ser dividida em duas categorias: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS)/ fermentação líquido (FL) (FS/ FL). No FES, os microrganismos crescem em condições controladas de materiais sólidos na ausência ou próximo da ausência de líquidos (KRISHNA, 2005). Este tipo de fermentação possibilita que os microrganismos utilizem os substratos por períodos prolongados, pois eles os degradam lentamente neste processo. Deste modo, esta técnica promove a liberação controlada de produtos. A FES é a técnica mais adequada para fermentação com fungos, pois eles não exigem elevado teor de umidade (HUSSAIN *et al.*, 2016). Este processo degrada a parede celular das plantas, levando a liberação de vários compostos antioxidantes (HUR *et al.*, 2014). Esta técnica é responsável ainda por aumentar a biodisponibilidade dos compostos bioativos, facilitando a conversão destes compostos nos seus metabólitos ou biotransformando componentes glicosídicos em agliconas (BAE *et al.*, 2004; JOO *et al.*, 2009).

Durante a fermentação os microrganismos liberam vários produtos. Na fase exponencial, os compostos liberados são responsáveis pelo crescimento microbiano e são chamados de metabólitos secundários, entre eles estão os antibióticos pépticos, pigmentos, enzimas e fatores de crescimento (BALAKRISHNAN e PANDEY, 1996; ROBINSON, SINGH e NIGAM, 2001; MACHADO *et al.*, 2004). A tanase é uma enzima que

pode ser produzida na fermentação por fungos filamentosos como *Paecilomyces variotii* (CHAMORRO *et al.*, 2012).

Estudos realizados com resíduo de laranja (MADEIRA *et al.*, 2014) e suco de laranja (FERREIRA *et al.*, 2013), biotransformados com o microrganismo *Paecilomyces variotii* e a enzima tanase produzida por esse fungo, respectivamente, mostraram um aumento da capacidade antioxidante após a reação em ensaios *in vitro* (ABTS, ORAC e DPPH). Ferreira *et al.* (2013) observaram a biotransformação dos polifenóis do suco de laranja através do acréscimo da enzima tanase obtida a partir do microrganismo *Paecilomyces variotii* nesses sucos. Os autores verificaram que houve a quebra de ligação glicosídica dos compostos, com redução da hesperidina e naringina, e conseqüentemente aumento da hesperetina e naringenina, demonstrando que essas formas possuem maior atividade antioxidante *in vitro* observada.

É importante considerar que as flavanonas em cítricos podem estar na forma glicosilada ou aglicona. Entre as agliconas, as mais comuns são a hesperetina e a naringenina, entretanto, essas formas apresentam-se naturalmente em baixas concentrações. As formas glicosiladas ainda são divididas em neohesperidosídeos, que contém uma neohesperidose (ramnosil- α -1,2 glicose) e apresentam sabor amargo, e rutinosídeos, que contém uma flavanona e um resíduo de dissacarídeo e não apresentam sabor (MACHEIX, FLEURIET e BILLOT, 1990). Naringina, neohesperidina e neoeriocitrina são exemplos de neohesperidosídeos; enquanto hesperidina, narirutina e didimina são exemplos de rutinosídeos (TRIPOLI *et al.*, 2007).

As laranjas e seus sucos são boas fontes dos flavonoides glicosilados (hesperidina e naringina), e contém cerca de 40 mg/100 g do alimento, mas perdas consideráveis ocorrem com a remoção da casca, antes do consumo ou no processo industrial (GALARRAGA, 2008). A casca dos cítricos apresenta elevado conteúdo de polifenóis, e diversos estudos demonstram os efeitos positivos dos extratos da casca no tratamento das doenças crônicas não-transmissíveis (FUKUCHI *et al.*, 2008; JUNG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; DING *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012; RAASMAJA *et al.*, 2013). Visto que, esses flavonoides podem atuar em diferentes etapas da cascata inflamatória, bloqueando as ações ou sínteses de mediadores inflamatórios (GABOR, 1979).

Os flavonoides hesperidina e naringina são resistentes ao suco gástrico e são absorvidos no trato gastrintestinal (AMEER *et al.*, 1996; HOLLMAN e KATAN, 1999). A análise dos produtos de excreção urinária após a ingestão de flavanonas isoladas (naringina e

hesperidina) de suco de laranja ou “grapefruit” evidenciou a presença de metabólitos destes compostos na urina, comprovando sua absorção pelo organismo (AMEER *et al.*, 1996). Foi verificada ainda uma variação considerável na taxa de absorção entre os indivíduos, possivelmente devido às diferenças da ação da microflora gastrintestinal na deglicosilação das flavanonas (ERLUND *et al.*, 2002). Ainda, a melhor absorção da forma agliconada em relação à glicosilada em flavonoides de cítricos já foi observada em estudo com humanos utilizando as formas glicosiladas eriocitrina e hesperidina, em comparação com as respectivas agliconas eridictiol, homoeridictiol e hesperetina (MIYAKE *et al.*, 2006).

Madeira *et al.* (2014) estudaram o efeito do processo de fermentação do microrganismo *Paecilomyces variotii* na biotransformação dos fenólicos presentes em resíduos de *citrus*. Os autores verificaram que a fermentação propiciou a produção de alguns compostos fenólicos com alta bioatividade, apontando a biotransformação microbiana como um caminho promissor para aumentar a concentração de compostos fenólicos com elevado potencial biológico.

Céliz *et al.* (2015) estudaram a síntese de hesperetina 7-O-glicosídeo de flavonóides extraídos de resíduos de *Citrus* utilizando enzimas livres e imobilizadas. Os autores avaliaram a produção de hesperetina 7-O-glucosídeo (HG) através da hidrólise da hesperidina (HES) e do seu isômero neohesperidina (NEO) presentes em resíduos de *citrus*. As enzimas livres utilizadas no estudo foram a naringinase e a hesperedinase, e a enzima imobilizada foi a α -ramnosidase. A HES não foi um substrato viável para a produção de HG, pois o processo foi fortemente limitado pela sua precipitação. Entretanto, a NEO foi um excelente substrato para a obtenção de HG, principalmente devido a sua alta solubilidade em água. Em relação às enzimas, todas foram capazes de obter HG com uma escala de pureza próxima a 100%.

Park *et al.* (2013b) avaliaram os efeitos protetores da administração oral do extrato de *Citrus* maduros (*C. unshiu*) biotransformados enzimaticamente pelas enzimas glucanotransferase e hesperidinase, em ratos com lesões hepáticas alcoólicas. Para verificar a ação anti-inflamatória desses fenólicos, os autores investigaram se houve uma inibição da degradação do I κ B- α por Western blotting, que conduz a ativação do NF- κ B. Os pesquisadores analisaram que tanto o extrato enzimático como o extrato sem tratamento reduziram a concentração de degradação de I κ B- α . As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos tecidos hepáticos foram analisadas por kits ELISA. Os autores observaram que o extrato enzimático suprimiu mais eficientemente a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 que o extrato sem tratamento.

A utilização de resíduos de *citrus* pode ser interessante devido à sua disponibilidade e recursos que permitem a obtenção de diferentes compostos fenólicos bioativos (MADEIRA *et al.*, 2014). Portanto a obtenção de compostos bioativos a partir desses resíduos ricos em compostos fenólicos é uma alternativa que merece atenção, pois minimiza o uso de compostos tóxicos na extração, como os solventes orgânico (MARTINS *et al.*, 2011; PURI, SHARMA e BARROW, 2012). A biotransformação de resíduos de *citrus* é um processo interessante para obter compostos fenólicos, pois necessita de poucos recursos para ser realizado. Além de fornecer destino mais nobre a esses resíduos (MADEIRA, 2014).

3.9 Caracterização das amostras biotransformadas

As amostras biotransformadas avaliadas neste trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas em trabalhos anteriores por Madeira *et al.*, (2014). Os autores desenvolveram o processo de biotransformação do extrato de *citrus* da indústria CPKelco (Limeira, SP, Brasil), otimizando os parâmetros de fermentação deste resíduo pelo microrganismo *Paecilomyces variotii* e o processo de biotransformação enzimática pelas enzimas celulase, tanase e pectinase. Neste mesmo trabalho, os extratos gerados foram caracterizados em relação ao teor de alguns flavonóides de interesse, seguindo a metodologia descrita por Ferreira *et al.* (2013). Os extratos foram analisados em HPLC (UltiMate[®] 3000) equipado com um coluna C18 (Waters[®], Massachusetts). Os compostos foram identificados através do tempo de retenção e dos espectros de UV-VIS (comprimento de onda de 260 nm). Padrões de hesperidina, hesperetina, naringina, naringenina, ácido elágico e gálico foram utilizados para as curvas de calibração e a quantificação foi realizada com um detector de arranjo de diodos. Todas as análises no HPLC foram realizadas a 30°C e o software Chromeleon 6.8[®] foi utilizado para o processamento de dados (FERREIRA *et al.*, 2013).

No processo de biotransformação fermentativa, foram detectados os fenólicos hesperidina e naringina, que reduziram sua concentração em 50 e 100% após 120 h de incubação, respectivamente. Os compostos fenólicos hesperetina, naringenina e ácido elágico também foram detectados após a biotransformação, e as suas concentrações iniciais estavam abaixo do limite de detecção. Após 48 h de fermentação, ocorreu a produção e a concentração máxima da hesperetina, naringenina e ácido elágico. Após 120 h, a concentração da hesperetina reduziu para 20% e, a naringenina e o ácido elágico não foram mais detectados. Os autores relatam que após 48 horas, houve uma redução dos fenólicos provavelmente pelo fato do microrganismo iniciar o consumo dos compostos fenólicos (MADEIRA *et al.*, 2014).

No processo de biotransformação enzimática, foram detectados os compostos fenólicos hesperidina e naringina que tiveram suas concentrações significativamente aumentadas. Os compostos fenólicos hesperetina, naringenina e ácido elágico também foram detectados. No início, as concentrações destes três polifenóis estavam abaixo do limite de detecção. Após 24 h de incubação, a hesperetina e a naringenina atingiram suas concentrações máximas, reduzindo em 80 e 90% em 30 h de incubação, respectivamente. O ácido elágico atingiu seu valor máximo em 5 horas de incubação, diminuindo 90% durante as próximas 20 horas de incubação. Todos os fenólicos mencionados acima tiveram a sua concentração reduzida depois de 25 horas de incubação (MADEIRA, 2014).

A redução da concentração destes polifenóis pode ser explicada pela degradação do produto final e/ou pela inativação das enzimas. A degradação pode ser resultado da oxidação dos fenólicos por exposição ao ar atmosférico (HAMZA, KHOUFI e SAYADI, 2012). A inibição enzimática pode ocorrer na celulase pela presença da celobiose, glicose e fenólicos e, na tanase por íons metálicos e fenólicos (LI, SMITH e HOSSAIN, 2006).

De acordo com os resultados encontrados por Madeira (2014), em 48 horas de biotransformação fermentativa são encontrados os valores máximos de hesperetina, naringenina e ácido elágico. Então, o processo fermentativo deve durar esse tempo para que o extrato possua a concentração limite destes fenólicos. O autor afirma também que na biotransformação enzimática, 24 horas é o tempo em que se encontram os valores máximos de hesperetina e naringenina. No processo enzimático o ácido elágico tem sua concentração máxima em 5 horas de incubação, portanto no tempo em que os valores de hesperetina e naringenina são máximos, o ácido elágico encontra-se com sua concentração reduzida em 90%. Mesmo com a concentração de ácido elágico reduzida, define-se que o processo enzimático deve durar 24 horas. Madeira (2014) afirma que as concentrações de hesperetina, naringenina e ácido elágico na biotransformação fermentativa foram 10, 21 e 190 vezes mais elevados do que na biotransformação enzimática, respectivamente. Além do extrato enzimático possuir a concentração de ácido elágico reduzida em 90%.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Compostos Bioativos (DEPAN-FEA-UNICAMP).

4.1 Material

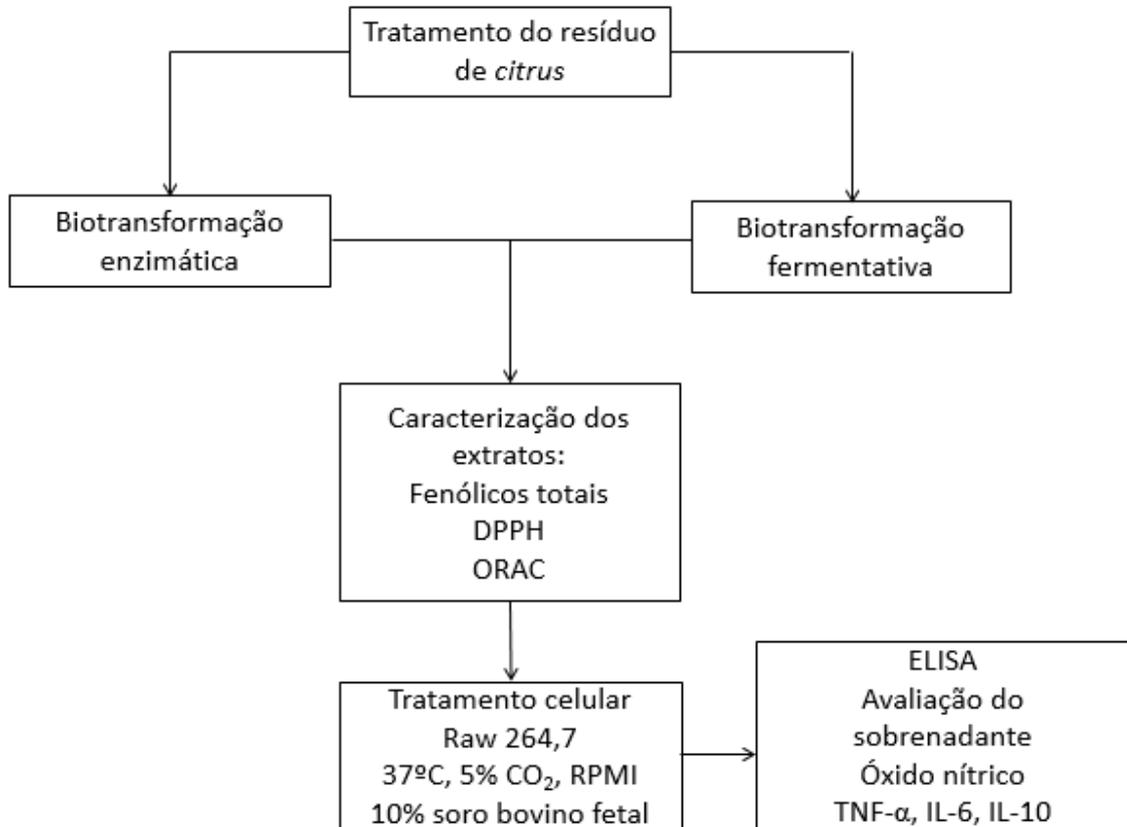
O bagaço de laranja, subproduto resultante do processamento de sucos concentrados, foi doado pela indústria *CPKelco* (Limeira, SP, Brasil). Para o processo de fermentação, foi utilizada a linhagem fúngica *Paecilomyces variotii*, isolada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos (DCA-FEA-UNICAMP) e depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos Ambientais e Industriais (CBMAI, número de identificação 1157).

O reagente Folin-ciocalteau foi adquirido da marca Dinâmica[®]. Os reagentes: ácido gálico, Trolox, DPPH, LPS e Fluoresceína utilizados são da Sigma-Aldrich[®]. Os kits de ELISA são da R&D Systems[®] e BD Bioscience[®] (EUA). Os demais reagentes são de grau analítico.

4.2 Métodos

A Figura 7 apresenta o fluxograma com a sequência de etapas experimentais realizadas no trabalho.

Figura 7 – Fluxograma geral das atividades realizadas na biotransformação e avaliação da bioatividade dos extratos fenólicos de resíduos de *citrus*.



4.2.1 Composição centesimal do resíduo de *citrus*

A umidade foi mensurada através da diferença na massa da amostra após secagem em estufa à 105°C, seguida de resfriamento em dessecador a temperatura ambiente (AOAC, 1997).

Os teores de cinzas foram determinados através da incineração em mufla da amostra a 550°C após 24 horas (AOAC, 1997).

A quantidade de proteínas foi determinada pelo método de Kjeldahl, conforme procedimento da AOAC (1997). Para quantificar o teor de proteínas, foi realizada a digestão da amostra em ácido sulfúrico e uma mistura catalisadora de sulfato de cobre e sulfato de potássio, seguida de destilação da amostra em meio básico por adição de hidróxido de sódio 40%, para a liberação da amônia que é recolhida em solução de ácido bórico. O borato de amônio foi quantificado por titulação com ácido clorídrico (0,02 N). Por fim, utilizou-se o fator de conversão de nitrogênio a proteína de 6,25 (UDENIGWE *et al.*, 2009).

A determinação do conteúdo de lipídeos foi feita pelo método de Bligh e Dyer (1959). Para quantificar o teor de lipídeos, a amostra foi agitada com uma solução de clorofórmio, metanol e água destilada por 30 minutos. Depois foi agitada com uma solução de clorofórmio e sulfato de sódio por 2 minutos e deixada em repouso para separar as camadas naturalmente por 24 horas. A seguir ocorreu a sucção da camada metanólica superior, a qual foi descartada, filtração da camada inferior e evaporação do solvente em estufa a 100°C. Pesou-se o que restou desses procedimentos.

A quantidade de carboidratos foi determinada por diferença. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.2.2 Processos de Biotransformação dos fenólicos de resíduos de cítricos

4.2.2.1 Preparo do resíduo de *citrus* antes da biotransformação fermentativa

O resíduo de *Citrus* foi triturado em um liquidificador (Black & Decker®) e depois peneirado (Mesh 10, tamanho de partícula 1,86 mm).

4.2.2.2 Microrganismo

A fermentação foi realizada pelo microrganismo *Paecilomyces variotii*. O *P. variotii* foi preservado em meio ágar batata (PDA) com vaselina sob temperatura de 4°C. Para a esporulação, a linhagem foi inoculada em placas de Petri com PDA com 2% de ácido tânico e incubada a 30 °C durante 3 dias. Os esporos foram suspensos em água destilada a uma concentração de 9×10^6 esporos/mL (MADEIRA, MACEDO e MACEDO, 2011).

4.2.2.3 Biotransformação (Processo fermentativo)

O processo fermentativo foi realizado de acordo com Madeira, Macedo e Macedo (2012). Em um Erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 10g do resíduo de *Citrus* e 10 mL de solução aquosa. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave vertical (Phoenix®- AV) durante 15 minutos a 121°C e 1 atm de pressão. Após resfriamento do meio, foi inoculado 1 mL da suspensão de esporos em cada Erlenmeyer e eles foram incubados à 30 °C, com 90 % de umidade relativa do ar (Câmara Climática 420 CLD – Nova Etica®, SP, Brazil) durante 48 horas. A extração foi realizada com etanol 50% em shaker durante 15 minutos, depois a

solução foi filtrada em funil com papel filtro, rotaevaporada (Tecnal[®]- TE-211), congelada no freezer a -80°C e liofilizada (Liotop[®] -L101). Esse extrato foi denominado extrato fermentado. A amostra controle desse extrato é composta pelo extrato autoclavado, que passou apenas pelo processo de esterilização em autoclave, extração com etanol 50%, filtração em funil com papel filtro, congelamento no freezer a -80°C e liofilização.

4.2.2.4 Preparo do resíduo de *citrus* antes da biotransformação enzimática

O resíduo de *Citrus* foi triturado em um liquidificador (Black & Decker[®]) e depois peneirado (Mesh 20, tamanho de partícula 0,80 mm).

4.2.2.5 Biotransformação (Processo enzimático)

Em um Erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 2 g do resíduo triturado e peneirado, 25 mL de solução tampão acetato a 0,02 mol.L⁻¹ em pH 5,5, com as enzimas Tanase e Celulase (5 U/ml). Em seguida, a amostra foi incubada em banho de agitação (Nova Ética[®]- Dubnoff) a 130 rpm à 40°C durante 24 horas. Após esse tempo a solução foi filtrada em funil com papel filtro, congelada no freezer a -80°C e liofilizada (Liotop[®] -L101) (MADEIRA, 2014). Esse extrato foi denominado extrato enzimático.

4.2.2.6 Extrato *in natura*

O resíduo de *citrus* que não passou por nenhum tipo de tratamento de biotransformação foi denominado extrato *in natura*. Para produção desse extrato, o bagaço foi triturado e peneirado da mesma forma descrita para o preparo do extrato fermentativo, depois foi realizada a extração dos fenólicos com etanol 50% em *shaker* durante 15 minutos, filtração em papel filtro, rotaevaporação (Tecnal[®]- TE-211), congelamento no freezer a -80°C e liofilização (Liotop[®] -L101).

4.2.2.7 Atividade Enzimática

Com o propósito de padronizar a atividade enzimática da tanase e da celulase empregada no processo de biotransformação enzimática em 5U/mL, os métodos discutidos a seguir foram utilizados. A atividade enzimática da tanase foi medida de acordo com o método

de Sharma, Bhat e Dawara (2000) com modificações. Soluções com ácido tânico (200 µg/mL em tampão acetato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,0), de extrato semipurificado de tanase (1000 µg/mL em tampão acetato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,0) e tampão acetato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,0, foram incubadas a 40 °C por 5 minutos em banho termostaticado.

O teste foi preparado com as soluções incubadas à 40°C, e o meio reacional foi composto por: 250 µL de solução de ácido tânico e 250 µL da solução do extrato semipurificado de tanase. O branco foi preparado com 250 µL de solução de ácido tânico e 250 µL de solução tampão acetato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,0. O controle foi preparado com 250 µL da solução do extrato semipurificado de tanase e 250 µL de solução tampão acetato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,0. O teste, o branco e o controle foram incubados em banho a 40°C por 5 minutos e, então receberam, respectivamente, com intervalo de 5 minutos entre cada reagente, 300 µL de solução de rodanina 0,665% em etanol (5-(4-dimetilaminobenzilideno)-rodanina 99%, Acros Organics®), 200 µL de uma solução de hidróxido de potássio 0,5 mol.L⁻¹ e 4 mL de água destilada.

Após 10 minutos, foram realizadas as leituras de absorvâncias em 520 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter®- DU 640), sendo o valor da absorvância calculado através da equação: $ABS_{520} = (A_{teste}) - (A_{controle} + A_{branco})$. A atividade enzimática foi avaliada por meio de uma curva de calibração com ácido gálico (Sigma®-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em tampão acetato 0,02 mol.L⁻¹ pH 5,0. Uma unidade da atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto sob as condições descritas.

A celulase é uma enzima comercial (Celluclast®) e o valor correspondente à sua atividade enzimática (700 U/g) foi fornecido pela empresa. Visto isso, a quantidade de enzima necessária foi calculada para atingir a atividade enzimática determinada pela metodologia de Madeira (2014) para a biotransformação enzimática.

4.2.3 Caracterização dos Extratos Obtidos

4.3.3.1 Determinação de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu

A determinação de fenólicos totais foi feita pelo método Folin-Ciocalteu (WU *et al.*, 2004). O meio de reação consistiu em 50 µL de amostras, 800 µL de água destilada e 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Dinamica®). O controle da amostra foi composto por 50 µL de água, 800 µL de água destilada e 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu. A solução padrão foi

composta por 50 µL de ácido gálico, 800 µL de água destilada e 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu. As soluções foram então agitadas em vórtex (Fisatom®- 774) e mantidas em repouso no escuro por 3 minutos. Depois, foram adicionados 100 µL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) em cada microtubo e, essas soluções foram homogeneizadas e incubadas por 2 horas no escuro. Em seguida, foram adicionadas 200 µL das soluções em cada poço de placas transparentes de 96 poços (TAP®).

As concentrações das amostras foram 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25g/mL. As concentrações da substância de referência (ácido gálico) para a elaboração da curva padrão foram de 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 16 µg/mL. A absorbância das amostras e amostra-padrão foram medidas em uma leitura única em leitor de microplaca (KHB®- ST-360) em comprimento de onda de 725 nm. Os resultados foram expressos como µg de ácido gálico equivalentes por mg de extrato (µg de AGE/mg). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos Extratos Obtidos

4.2.4.1 Ensaio de DPPH

A análise de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi realizada conforme metodologia descrita por Peschel *et al.* (2006) adaptado por Macedo *et al.* (2011). As amostras foram dissolvidas em metanol 70 % e, as concentrações utilizadas de amostra foram de 1 mg/mL, 0,5g/mL e 0,25 mg/mL. O padrão da substância referência Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, AcrosOrganics®) foi preparado em metanol 70 % e, as concentrações utilizadas foram de 375 µmol/mL, 300 µmol/mL, 150 µmol/mL, 90 µmol/mL, 75 µmol/mL, 30 µmol/mL e 15 µmol/mL.

O meio de reação consistiu em 50 µL de amostra e 150 µL da solução de DPPH (0,2 mmol.L⁻¹ em etanol) (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha). Foi preparado também um controle de absorbância da amostra com 50 µL de amostra e 150 µL de metanol 70%, um controle do metanol composto por 200 µL de metanol 70% e um controle do DPPH com 50 µL de metanol 70% e 150 µL de solução de DPPH. A solução padrão foi constituída por 50 µL de Trolox® e 150 µL de DPPH. Todas as soluções foram pipetadas diretamente nas placas transparentes de 96 poços (TAP®).

A absorbância das amostras e amostra-padrão foram medidas durante 36 minutos em Fluorímetro FluostarOptimo® (BMG LABTECH, Alemanha) com comprimento de onda

de 520 nm. A atividade antioxidante foi calculada a partir da equação obtida por regressão linear das determinações de DPPH do padrão Trolox[®] e os resultados expressos como μg de Trolox[®] equivalentes por mg de extrato (μmol Trolox/mg). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4.2 Capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC

O método ORAC foi realizado conforme metodologia descrita por Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2004). As amostras foram diluídas em tampão fosfato (75 mmol.L^{-1} pH 7,4) e as concentrações de amostra utilizadas foram: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,01 mg/mL. O padrão da substância referência Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, AcrossOrganics, Belgica) foi preparado em tampão fosfato (75 mmol.L^{-1} pH 7,4) e as concentrações da curva padrão foram de 1,5- 900 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O meio de reação consistiu em 20 μL de amostra, 120 μL de Fluoresceína (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) e 60 μL de APPH (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha). Foi preparado também um controle de absorbância da amostra com 20 μL de tampão fosfato, 120 μL de Fluoresceína e 60 μL de APPH, um controle do tampão fosfato composto por 200 μL de tampão fosfato (75 mmol.L^{-1} pH 7,4) e um controle da Fluoresceína constituído por 200 μL de Fluoresceína. A solução padrão foi constituída por 20 μL de Trolox[®], 120 μL de Floresceína e 60 μL de APPH. Todas as soluções foram pipetadas diretamente nas placas de cor preta de 96 poços (TAP[®]). A fluorescência foi monitorada a cada 1 minuto durante 1 hora e 30 minutos, em Fluorímetro FluostarOptimo[®] (BMG LABTECH, Alemanha) a 37°C , com filtro de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm.

A atividade antioxidante foi calculada pela diferença entre a área sob a curva de decaimento da fluoresceína de cada amostra pela área do branco (net AUC). Os resultados foram expressos como μg de Trolox equivalentes por mg de extrato (μg de Trolox/mg). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5 Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos obtidos em ensaios celulares

4.2.5.1 Cultura celular

A linhagem celular utilizada foi a de macrófagos de murinos RAW 264.7, gentilmente cedida pela professora Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, do Instituto de Biologia da UNICAMP e estabelecida no laboratório de Compostos Bioativos da FEA-UNICAMP. A linhagem foi cultivada em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mL.L⁻¹ de penicilina/estreptomicina (Gibco® BRL, NY, USA), a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.2.5.2 Avaliação da ação citotóxica dos extratos

O ensaio de viabilidade celular ou MTT consiste em um teste de redução do sal de tetrazólio (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) descrito por Mosmann (1983) com adaptações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^5 células/mL e incubadas por 24 horas (37°C, 5% CO₂). Depois desse período, foram expostas as seguintes concentrações dos extratos: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL e incubadas novamente por 24 horas. Após incubação, foram adicionados nos poços 10 µL de MTT (5mg/ml) e foram incubadas por 4 horas. Em seguida, receberam 10 µL de DMSO (dimetilsulfóxido).

A absorbância das amostras foi lida a 540 nm, usando leitor de microplacas (KHB®- ST-360). Controles positivos foram feitos com células sem tratamento, apenas com o meio de cultura celular (100% de viabilidade celular). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5.3 Ensaio de ação anti-inflamatória em Macrófagos

Esse ensaio foi adaptado de Kao, Huang e Chen (2012) do método descrito por Cho *et al.* (2008). A linhagem de macrófagos foi plaqueada na densidade de 1×10^5 células/poço na placa de 24 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Depois disso, o meio foi trocado por meio de cultura fresco, contendo os extratos em duas concentrações diferentes: 1mg/mL e 0,2 mg/mL, separadamente. Imediatamente depois, 1 µg/mL de LPS foi

adicionado no meio de cultura, e as placas foram incubadas por 24 h para estimular a produção de citocinas. As análises das concentrações do TNF- α , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes da cultura foram feitas por kits de ELISA, segundo orientação dos fabricantes. Para quantificar a concentração de TNF- α , os sobrenadantes sem e com o estímulo inflamatório (LPS) foram diluídos em meio nas proporções de 1:4 e 1:50, respectivamente. Para quantificar a concentração de IL-6, os sobrenadantes sem estímulo inflamatório não foram diluídos e, os sobrenadantes com estímulo inflamatório com a concentração de 0,2 mg/mL de amostra foram diluídos em meio na proporção de 1:20. Os sobrenadantes com estímulo inflamatório com as amostras na concentração de 1 mg/mL não foram diluídos. Para quantificar o conteúdo de óxido nítrico e IL-10 as amostras não foram diluídas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5.4 Óxido nítrico

A determinação de óxido nítrico foi realizada de acordo com Green *et al.* (1982). A concentração de nitrito foi medida como um indicador da produção de NO utilizando o reagente de Griess (sulfanilamida a 1%, ácido fosfórico a 5% e de N -(1-naftil) etilenodiamina a 0,1%). Inicialmente, foram pipetados em uma microplaca de 96 poços, 50 μ L de sobrenadante celular das culturas com e sem estímulo inflamatório, depois foi adicionado 50 μ L do reagente de Griess.

A absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas e a concentração de nitrito nas amostras foi determinada por comparação com uma curva padrão de nitrito de sódio (5 a 320 μ M). O controle celular foi composto pelo meio de cultura celular.

5. ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística entre as diferentes amostras na mesma concentração foi utilizada a análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. O teste de Dunnet foi empregado para comparar as amostras na mesma concentração com o controle composto apenas com o meio celular. O teste t também foi utilizado para comparar as médias entre as duas concentrações testadas da mesma amostra. Os resultados foram expressos como médias e desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo software GraphPad Prism 5.0[®].

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Composição centesimal do bagaço de *citrus*

Os resultados obtidos na caracterização da composição centesimal do bagaço de *citrus* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal do Bagaço de *citrus* expressa em porcentagem (%) em base seca.

Bagaço de <i>citrus</i>	Média (%)
Proteínas (%)	6,00±0,27
Lipídios (%)	2,18±0,13
Cinzas (%)	2,66±0,02
Umidade (%)	11,85±0,18
Carboidratos (%)*	77,29

Valores expressos como média ± desvio padrão. *Valores obtidos para carboidratos por diferença (% Carboid. = 100- (proteínas + umidade + lipídeos + cinzas).

A composição centesimal do bagaço de *citrus* indica que ele é formado em sua maior parte por carboidratos, 77,29 %. A média do teor de proteínas encontrada foi de 6%, a de lipídios foi de 2,18%, a média do teor de cinzas encontrada foi de 2,66 % e a umidade foi de 11,85%. É importante salientar que este lote possui essas características, entretanto elas variam com a safra.

6.2 Compostos fenólicos totais (FT)

Os compostos fenólicos, por possuírem capacidade de inibição de radicais e função antioxidante, são componentes reconhecidos por atuarem na prevenção de doenças cardiovasculares e cancerígenas (SHUKLA *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 2014). Subprodutos de *citrus* podem ser boas fontes de fenólicos e as cascas possuem grandes quantidades destes compostos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

O ensaio de compostos fenólicos totais utilizando o reagente Folin-Ciocalteu é um dos métodos mais empregados para quantificar o teor de fenólicos de um extrato de planta. Após a reação com agentes redutores, um complexo de cor azul é formado, que pode então ser analisado através de espectrofotometria. O reagente é muito reativo com grupamentos OH, os quais estão presentes em compostos fenólicos (IKAWA *et al.*, 2003).

O conteúdo de fenólicos totais estão expressos em μg de ácido gálico/mg de amostra e apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Conteúdo de compostos fenólicos totais (μg AGE /mg de amostra).

Amostra	Fenólicos Totais (μg AGE/mg de amostra)
Autoclavado	16,11 \pm 1,09 ^b
Fermentado	21,65 \pm 3,02 ^a
<i>In natura</i>	19,49 \pm 2,72 ^a
Enzimático	13,39 \pm 2,72 ^b

Valores expressos como média \pm desvio padrão. O teste Tukey comparou médias entre as diferentes amostras. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observa-se que o extrato fermentado teve maior concentração de compostos fenólicos totais e foi estatisticamente diferente do seu controle, o extrato autoclavado. Entretanto, o extrato fermentado não exibiu diferença estatística do extrato *in natura*. O extrato enzimático apresentou uma menor concentração de compostos fenólicos totais que o extrato *in natura*. Em relação aos dois tratamentos, é importante ressaltar que o extrato fermentado teve maior concentração de compostos fenólicos que o extrato enzimático, apresentando uma diferença estatística entre os dois.

Xu *et al.* (2014) avaliaram a biotransformação enzimática feita pelas enzimas celulase, pectinase e β glicosidase em extratos de cascas e sementes de uva Muscadine (*Vitis rotundifolia Michx*). Eles verificaram que o extrato enzimático da casca de uva teve menor concentração de fenólicos totais em comparação com o extrato feito apenas com um solvente (etanol 50%). Observa-se que no presente estudo o resultado encontrado foi o mesmo, visto que na concentração de 1mg/mL a quantidade de fenólicos totais do extrato enzimático foi menor que a encontrada no extrato *in natura*, o qual foi feito também apenas com um solvente (etanol 50 %). Os autores explicam que pelo fato do solvente de extração dos fenólicos da uva Muscadine ser tampão, pode ter acarretado uma extração com quantidade significativa de fenólicos solúveis em água e, não ter extraído os fenólicos insolúveis em água. Essa explicação é viável para este estudo, pois como o extrato enzimático desta pesquisa também foi feito somente com tampão, ele pode conter apenas fenólicos solúveis em água e ser carente de fenólicos solúveis em outros solventes. Assim, o extrato enzimático possui menor

concentração de fenólicos totais que as outras amostras, pois os outros extratos foram extraídos com etanol 50%. O etanol por possuir características polares e apolares, pode extrair tanto fenólicos solúveis em água como fenólicos insolúveis em água. Por isso, justifica-se a maior concentração de fenólicos totais nas amostras extraídas com o etanol 50%.

Li, Smith e Hossain (2006) testaram a extração enzimática de compostos fenólicos presentes na casca de frutas cítricas por três enzimas: Cellulase[®] MX, Cellulase[®] CL e Kleerase[®] AFP. Eles verificaram que a enzima Kleerase[®] AFP aumentou em 24% a extração do teor de compostos fenólicos presentes na casca de laranja, entretanto as outras duas enzimas testadas não demonstraram efeito significativo no estudo. Os autores explicam que as enzimas hidrolisam a parede celular das frutas, por isso que essa extração dos compostos fenólicos poderia ser mais eficiente. Entretanto, quando as células são rompidas ocorre à liberação de proteínas, que podem formar complexos com compostos fenólicos, podendo reduzir o conteúdo de fenólicos livres. Os pesquisadores explicam também que o uso da enzima Kleerase[®] AFP foi mais eficiente porque ela tem a capacidade de hidrolisar proteínas, podendo reduzir a complexação de compostos fenólicos com proteínas. O mesmo pode ter ocorrido no presente estudo, pois na extração enzimática a enzima celulase pode ter hidrolisado a parede celular do bagaço de *citrus*, liberando proteínas, que se complexaram com os compostos fenólicos, acarretando a redução da concentração de fenólicos livres.

Madeira *et al.* (2014) relatam que o aumento da concentração de compostos fenólicos na biotransformação fermentativa pode estar relacionado com o acréscimo da concentração de ácido elágico a partir da degradação de taninos simples. Shi *et al.* (2005) encontraram em seu trabalho que os fungos *Aspergillus niger* e *Candida utilis* acumularam ácido elágico através da biodegradação de taninos valonia. Apesar das vias de degradação de taninos serem pouco conhecidas, o mesmo pode ter ocorrido no presente estudo, visto que existiu uma maior acumulação de ácido elágico na biotransformação fermentativa do que na biotransformação enzimática, segundo análises de caracterização das amostras realizadas por Madeira (2014).

É importante observar que, apesar dos compostos fenólicos dos extratos biotransformados não terem apresentado um grande aumento nas suas concentrações, o perfil destes polifenóis mudaram segundo a caracterização dos extratos realizada por Madeira (2014). Visto que, após a biotransformação enzimática e fermentativa os fenólicos glicosilados tornaram-se agliconados, considera-se que essa mudança modificou as características destes fenólicos. Este fato pode levar a ações diferentes dos mesmos no processo inflamatório.

Espécies de *Citrus* de várias origens vem sendo estudadas devido a sua gama de compostos fenólicos e a sua capacidade antioxidante (GORINSTEIN *et al.*, 2001; ABEYSINGHE *et al.*, 2007; RAPISARDA *et al.*, 2008; GHASEMI, GHASEMI e EBRAHIMZADEH, 2009). Entretanto, a composição química dos frutos varia com o clima, tipo de solo, cultivar, maturação dos frutos, e ainda entre as partes do mesmo fruto, influenciando na concentração e na estrutura dos fenólicos (BARROS, FERREIRA e GENOVESE, 2012). Além disso, o conteúdo de compostos fenólicos varia de acordo com o tipo de solvente utilizado na extração e com a temperatura durante o processo (LI, SMITH e HOSSAIN, 2006).

6.3 Capacidade antioxidante - DPPH

O método consiste na redução da forma estável do radical livre 1,10-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) na presença de antioxidantes, os quais doam um átomo de hidrogênio, originando a forma reduzida de DPPH chamada de hidrazina, ocasionando a mudança de cor do meio reacional de violeta para amarelo, cuja absorbância é mensurada espectrofotometricamente (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013; TAN e LIM, 2015).

As atividades antioxidantes determinadas pelo método DPPH estão expressas em μmol de Trolox/mg de amostra e apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade antioxidante pelo método DPPH (μmol Trolox Equiv. /mg de amostra).

Amostra	DPPH* (μmol Trolox /mg de amostra)
Autoclavado	123,64 \pm 25,80 ^a
Fermentado	129,86 \pm 14,97 ^a
<i>In natura</i>	91,68 \pm 7,35 ^b
Enzimático	97,88 \pm 30,17 ^b

*DPPH (1,10-difenil-2-picrilhidrazil).

Valores expressos como média \pm desvio padrão. O teste Tukey comparou médias entre as diferentes amostras. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observa-se que o extrato fermentado não teve diferença significativa em relação à capacidade antioxidante contra o radical DPPH que o seu controle, o extrato autoclavado. O extrato fermentado apresentou maior capacidade antioxidante que o extrato *in natura*, demonstrando diferença significativa. O extrato enzimático não apresentou diferença estatística do extrato *in natura*. Em relação aos dois tratamentos, o extrato fermentado obteve maior capacidade antioxidante que o extrato enzimático, exibindo diferença significativa, pelo método DPPH.

O extrato fermentado e autoclavado passaram por tratamentos térmicos (etapa de autoclavagem do bagaço), e estudos vêm demonstrando que técnicas de processamento térmico, como vapor, autoclavagem, secagem em tambor e aquecimento por micro-ondas, melhoram a extração de compostos fenólicos nas plantas (BRYNGELSSON, DIMBERG e KAMAL-ELDIN, 2002; ZHANG *et al.*, 2010). Autores relatam que a autoclavagem de farelo de arroz aumentou a atividade antioxidante pelo método DPPH, provavelmente porque o tratamento ocasionou a formação de compostos como os produtos da reação de Maillard com uma forte atividade antioxidante (DONA, 2011). Este fato pode explicar o elevado potencial antioxidante pelo método DPPH, tanto do extrato fermentado como do autoclavado, pois ambos passaram por este processo. O fato do extrato autoclavado ter apresentado menor concentração de compostos fenólicos e mesmo assim, exibir elevada atividade antioxidante pode ser justificado pela formação de produtos da reação de Maillard com uma forte atividade antioxidante, como relatado no estudo citado acima.

Casquete *et al.* (2015) investigaram a atividade antioxidante pelo método DPPH na extração de fenólicos em alta pressão de *citrus sinensis*. Em relação às amostras que sofreram tratamentos em alta pressão, a maior capacidade antioxidante foi atingida com 300 MPa / 3 min, que foi de 114,21 mg Trolox/g de amostra. O resultado encontrado pelos autores mostrou que este tipo de extração teve uma atividade antioxidante pelo método de DPPH parecida com o extrato *in natura* do presente estudo que foi de 97,88 μmol Trolox/mg de amostra, extrato feito com etanol 50%. Este fato indica que apenas com o solvente etanol 50% pode-se ter uma extração de compostos com uma boa atividade antioxidante. Observa-se também que o tratamento fermentado do presente estudo demonstrou ser um processo viável, pois teve uma maior atividade antioxidante pelo método DPPH que a extração em alta pressão e que a extração feita com etanol 50%.

Goulas e Manganaris (2012) analisaram o potencial antioxidante de *citrus* cultivados em Chipre, uma ilha situada no norte da Turquia. Eles verificaram que os extratos

de polpa e casca derivados de um híbrido denominado “Mandora” e a variedade de laranja “Valência” apresentaram a maior capacidade antioxidante comparados com os outros extratos. Os autores referiram que a maior atividade antioxidante foi atribuída principalmente a presença do flavonóide hesperidina, pois segundo Wilmsen, Spada e Salvador (2005) este composto reduziu significativamente o nível do DPPH, com um valor parecido com o encontrado pelo Trolox. Com base na caracterização das amostras realizada no trabalho de Madeira (2014), observa-se que o flavonoide hesperidina foi detectado. Podemos supor que a presença deste composto foi responsável por parte da atividade antioxidante das amostras, principalmente as que não passaram pelos processos de biotransformação, este que realiza a conversão de hesperidina em hesperetina.

A estrutura dos flavonoides é totalmente relacionada com a sua capacidade antioxidante. Normalmente, compostos glicosilados possuem menor capacidade antioxidante que as suas formas agliconas (KIM e LEE, 2004). Observa-se no presente estudo que os dois processos de biotransformação enzimática e fermentativa apresentaram um aumento na concentração de compostos fenólicos agliconas, como a hesperetina e naringenina, após as reações. Entretanto, em relação a capacidade antioxidante apenas o tratamento fermentativo demonstrou ser mais eficiente, pelo método DPPH, do que o tratamento enzimático. Além disso, observamos que diante desses resultados, a biotransformação fermentativa parece não apresentar grandes vantagens em relação ao seu extrato controle, o autoclavado, demonstrando que apenas o tratamento térmico foi eficaz em aumentar a atividade antioxidante dos extratos por DPPH.

6.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC

O ensaio ORAC mede a capacidade de um antioxidante em sequestrar radicais livres através da doação do átomo de hidrogênio (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005). O resultado é calculado a partir do equivalente Trolox e expresso como valor ORAC. Quanto maior for o valor ORAC, maior é a atividade antioxidante da amostra (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013).

Uma vantagem do método ORAC é que os radicais utilizados no ensaio como o peroxila ou hidroxila são os radicais mais prevalentes na biologia humana, o que indica que o ensaio demonstra aproximação com os padrões biológicos. Outra vantagem é que o ensaio é adaptável para uma variedade de matrizes de amostras, como plasma, tecido e alimentos (PRIOR, 2015).

As atividades antioxidantes das amostras determinadas pelo método ORAC estão expressas em μmol de Trolox/mg de amostra e apresentam-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antioxidante pelo método ORAC (μmol Trolox Equiv. /mg de amostra).

	Equivalente de Trolox ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de amostra)	Faixa de concentração (mg/mL)	Coef. angular	Coef. linear	R ²
Autoclavado	509,72±50,97 ^{a,b}	0,2-1,0	24,89	3,33	0,98
Fermentado	471,94 ± 134,84 ^a	0,1-1,0	22,70	4,61	0,98
<i>In natura</i>	746,20±155,09 ^b	0,1-0,2	26,56	6,56	0,98
Enzimático	284,40±58,25 ^a	0,2-1,0	17,74	2,39	0,99

Valores expressos como média \pm desvio padrão. O teste Tukey comparou médias entre as diferentes amostras. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O extrato fermentado teve um menor potencial antioxidante pelo método ORAC em relação ao seu controle, o autoclavado, entretanto, não existiu diferença significativa. O extrato fermentado mostrou uma menor concentração em relação ao extrato *in natura*. O extrato enzimático também teve menor potencial antioxidante pelo método ORAC que o extrato *in natura* e, exibiu diferença significativa. Em relação aos dois tratamentos, o extrato fermentado demonstrou maior capacidade antioxidante que o extrato enzimático, entretanto, não se pode concluir que o extrato fermentado foi mais eficaz porque não existiu diferença significativa entre os dois extratos neste ensaio.

Kim, Shin e Jang (2009) investigaram a influência da biotransformação microbiana e enzimática em extratos de Dangyuja (*Citrus Grandis Osbeck*) na capacidade antioxidante e antidiabética dos extratos. O extrato enzimático foi transformado com naringinase e hespereridinase e o extrato microbiano foi transformado com *Aspergillus saitoi*. Eles relataram que, tanto o tratamento microbiano como o enzimático, aumentaram a capacidade de eliminar radicais peróxido e hidróxido dos extratos. Segundo os autores, este fato está relacionado com o surgimento de mais formas agliconas pelas duas

biotransformações. Entretanto, no presente estudo, as amostras que sofreram biotransformação enzimática e fermentativa foram as que tiveram seu menor valor ORAC.

Kim *et al.* (2016) investigaram a capacidade antioxidante de um suco composto por uma mistura de espécie de *citrus*. Eles relataram que o valor ORAC da mistura foi de 468,42 $\mu\text{mol/g}$, valor próximo ao do extrato fermentado no presente estudo. Os autores referem que a propriedade antioxidante da mistura é originada pela sua capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) Os flavonóides de *citrus* são conhecidos pela sua capacidade de doar átomos de hidrogênio para essas moléculas, tornando-as estáveis e não reativas (BURDA e OLESZEK, 2001; MAJO *et al.*, 2005).

Observa-se que a concentração dos compostos fenólicos está relacionada com a capacidade antioxidante pelo método DPPH. Entretanto, os valores de compostos fenólicos totais não estão relacionados diretamente com os valores de ORAC. A correlação entre os teores de fenólicos totais e DPPH é, normalmente muito alta devida a natureza dos ensaios. Já a relação desses dados com os de ORAC nem sempre é significativa.

Como discutido nos resultados do DPPH a estrutura dos flavonoides influencia na sua capacidade antioxidante. Além disso, a época de semeadura e estádios de maturação também estão relacionadas com o potencial antioxidante dos frutos de *citrus*. A maturação é um fator importante relacionado com a capacidade antioxidante do fruto, pois os frutos quando colhidos amadurecidos possuem quantidades menores de compostos fenólicos que os frutos ainda não maduros. Portanto, frutos colhidos maduros também possuem menor potencial antioxidante (PANTELIDIS *et al.*, 2007). Os frutos orgânicos também possuem maiores teores de fenólicos totais, portanto, maior capacidade antioxidante que os frutos convencionais (WANG *et al.*, 2008).

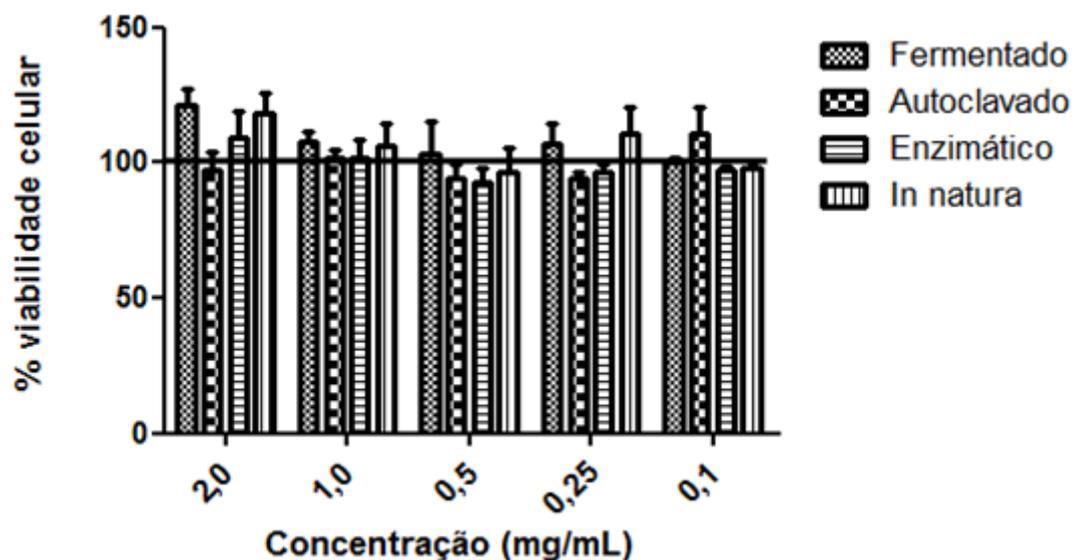
6.5 Viabilidade celular pelo ensaio MTT

O ensaio MTT proposto por Mosmann (1983) é um método desenvolvido para avaliar a viabilidade celular e toxicidade de diferentes amostras. O MTT é um sal de tetrazólio (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) que sofre clivagem por desidrogenases presentes nas células metabolicamente ativas. Uma vez reduzido, esse sal origina o formazan. A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. No entanto, variações de aproximadamente 15% da viabilidade celular podem não representar morte celular ou citotoxicidade, mas variações na taxa metabólica das

células por influência da amostra testada. Consideramos ação tóxica decréscimos de mais de 15-20% da viabilidade celular.

A porcentagem de viabilidade celular após exposição das amostras nas concentrações de 0,1 a 2 mg/mL em relação ao controle de células sem tratamento (100% de viabilidade celular), está apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Porcentagem de viabilidade celular após exposição das amostras em relação ao controle de células sem tratamento (100% de viabilidade celular).



Observa-se que em nenhuma concentração testada existiu uma significativa redução de células viáveis, pois a viabilidade celular não foi menor que 85% em nenhuma das amostras nas concentrações testadas. Portanto, nenhuma das amostras foi tóxica para as células nas concentrações avaliadas e puderam ser utilizadas nos ensaios subsequentes.

6.6 Concentração de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula ou substância de sinalização que participa em várias etapas dos processos patológicos, tais como inflamação e apoptose. Níveis elevados de NO surgem a partir de estímulos inflamatórios e são responsáveis por mediar os efeitos pró-inflamatórios nas células (KORHONEN *et al.*, 2005). A síntese de NO depende da expressão da enzima iNOS, que é induzida pelo TNF- α (GREEN, NACY e MELTZER, 1991;

NATHAN e HIBBS, 1991). A elevação da concentração de NO está relacionada ao surgimento de vários distúrbios associados com doenças inflamatórias crônicas (LAMAS, PÉREZ-SALA e MONCADA, 1998). Vários flavonoides são conhecidos por sua atividade anti-inflamatória e, sua ação na inflamação tem sido associada a sua capacidade em suprimir a produção de NO em macrófagos (KIM *et al.*, 1999; MATSUDA *et al.*, 2003).

O conteúdo de óxido nítrico no sobrenadante celular com e sem estímulo pró-inflamatório (LPS) nas concentrações de amostras de 0,2 e 1 mg/mL está expresso em pg/mL e está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentração de óxido nítrico (NO) (pg/mL) no sobrenadante celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após a exposição das amostras.

Estímulo inflamatório	Concentração extrato (mg de amostra/mL)	Concentração de óxido nítrico (pg/mL) em cada tratamento celular				
		Fermentado	Autoclavado	Enzimático	<i>In natura</i>	Controle
Ausente	1,0	ND**	ND	ND	ND	ND
	0,2	ND	ND	ND	ND	
Presente	1,0	ND	ND	ND	ND	3,82±2,92
	0,2	6,44±0,16 ^a	4,43±3,58 ^a	ND	6,34±0,86 ^a	

Estímulo inflamatório avaliado pela presença ou ausência de lipopolissacarídeos. Valores expressos como média ± desvio padrão. O teste Tukey comparou médias de diferentes amostras na mesma concentração. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. **ND=Não detectável. Valores identificados com * são considerados estatisticamente diferentes do controle pelo teste de Dunnet.

Observa-se que na ausência de estímulo inflamatório (LPS), as amostras não produziram óxido nítrico em contato com nenhuma das concentrações das amostras testadas. O fato das amostras não induzirem a produção de óxido nítrico na ausência de estímulo inflamatório sugere que os extratos não possuem características inflamatórias em relação a este ensaio. Visto que, o óxido nítrico possui um efeito citotóxico para as células. Não é possível observar efeitos anti-inflamatórios nas condições desse ensaio, uma vez que o controle (células não tratadas) já não apresentava teores mensuráveis de NO, significando que as células não estavam em condições de estresse pró-inflamatório que pudesse ser remediado pelas amostras.

Na presença do estímulo inflamatório, verificou-se que as células controle apresentaram teor mensurável de NO, demonstrando que o estímulo com LPS causou efeito esperado na cultura celular. Em relação aos tratamentos na concentração de 1 mg/mL não houve produção de NO em nenhuma das amostras, evidenciando que todas as amostras nesta concentração protegeram as células, inibindo a produção de um indicador inflamatório, que é o óxido nítrico. Nessa concentração mais elevada, não houve distinção entre os extratos, sendo que todos foram efetivos na inibição do NO. Já na concentração de 0,2 mg/mL, nas células estimuladas com LPS, o extrato enzimático foi o único a ser efetivo na inibição da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. As demais amostras apresentaram teores de NO estatisticamente semelhantes ao teor observado no sobrenadante das células sem tratamento (controle), indicando que nessa concentração testada, não são eficientes na inibição da produção estimulada por LPS de NO em macrófagos.

Kim *et al.* (2013) estudaram o efeito anti-inflamatório do óleo essencial de uma variedade de *citrus*: o *Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis*. Os autores observaram, pelo método Western Blot, que ocorreu uma redução nos níveis de expressão da enzima iNOS e como o óxido nítrico é produto das reações catalisadas pela iNOS, então ocorreu redução também nos níveis do NO. Esse mecanismo observado nesse estudo pode ser o mesmo que justifique o observado no ensaio com a concentração de 1 mg/mL, em que todas as nossas amostras inibiram a produção de NO. A inibição da produção de NO pode ter sido resultado da redução dos níveis da expressão da proteína iNOS nas células. Para comprovar essa hipótese, ensaios para determinar a concentração da proteína iNOS seriam relevantes para compreender a redução do óxido nítrico pelas amostras.

Ahmed *et al.* (2014) verificaram o efeito da naringenina e da L-arginina na redução da iNOS em animais com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. As amostras foram testadas juntas e separadas. Observaram que existiu uma redução na iNOS no pulmão dos animais e, a menor redução foi verificada quando usaram as amostras juntas. Kim *et al.* (1999) explica que o mecanismo celular que regula a enzima iNOS pelos flavonoides, entre eles a naringenina, é feito pela regulação da ativação do NF- κ B, que é responsável pela transcrição de iNOS. Através da caracterização das amostras deste estudo, pode-se observar que a naringenina é um composto presente nos extratos. Portanto, este flavonoide pode não ter ativado o NF- κ B, ocasionando a não transcrição de iNOS. Por isso, as amostras estudadas foram eficazes em reduzir a concentração de NO.

Sakata *et al.* (2003) avaliaram a inibição da produção do NO e da expressão da iNOS pelo flavonóide hesperidina em células de macrófagos RAW 264,7, estimuladas por LPS. Os autores verificaram que houve uma redução na produção de NO em células tratadas com a hesperidina e, que esta inibição ocorreu pela supressão gênica da iNOS. Salvemini *et al.* (1993) relatam que a diminuição da expressão gênica da iNOS e conseqüentemente, redução da produção do NO acarretam em uma ação anti-inflamatória. O mesmo pode ser observado no presente estudo, pois a hesperidina está presente nas amostras estudadas. Este composto pode ter reduzido a expressão da iNOS, diminuindo a concentração do NO das amostras e ocasionando uma ação anti-inflamatória.

6.7 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- α)

O TNF- α induz e perpetua a inflamação através da ativação de células T e macrófagos, junto com a regulação positiva de outras citocinas pró inflamatórias, aumentando assim o recrutamento de leucócitos para a região inflamada (BEUTLER, 1995). Portanto, bloquear a sua expressão pode ser um mecanismo viável para o tratamento de doenças inflamatórias (YING *et al.*, 2013).

A Tabela 6 apresenta o conteúdo de TNF- α , expresso em pg/mL, no sobrenadante celular com e sem estímulo inflamatório, nas células tratadas com as concentrações de 0,2 e 1 mg/mL dos extratos estudados.

Tabela 6 – Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- α) (pg/mL) no sobrenadante de cultivo celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após a exposição das amostras.

Estímulo inflamatório	Concentração extrato (mg de amostra/mL)	Concentração de TNF- α (pg/mL) em cada tratamento celular				
		Fermentado	Autoclavado	Enzimático	<i>In natura</i>	Controle
Ausente	0,2	1.617,33±94,31 ^{a,b}	1.606,59±91,77 ^a	1.802,15±257,01 ^a	1.083,44±93,66 ^{b*}	1.659,56±198,85
	1,0	1.142,33±44,16 ^{a*}	988,07±101,96 ^{a,c*}	1.873,26±325,63 ^b	610,11±103,87 ^{c*}	
Presente	0,2	24.249,42±1.021,29 ^a	21.316,28±1.653,32 ^{a,b*}	17.159,30±2.808,45 ^{b*}	22.447,09±3.864,27 ^{a,b}	29.048,84±4.719,53
	1,0	16.836,63±2.362,91 ^{a*}	16.865,70±997,94 ^{a*}	15.781,40±2.353,88 ^{a*}	12.784,30±6.224,04 ^{a*}	

Estímulo inflamatório avaliado pela presença ou ausência de lipopolissacarídeos. Valores expressos como média \pm desvio padrão. O teste Tukey comparou médias de diferentes amostras na mesma concentração. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Valores identificados com * são considerados estatisticamente diferentes do controle pelo teste de Dunnet.

Na ausência de estímulo inflamatório, o controle é o sobrenadante das células que não foram expostas a nenhum tratamento com os extratos estudados. Observa-se nesse caso, que as células controle produzem um teor mensurável de TNF- α , mas que é uma concentração quase 30 vezes mais baixa do que das células que foram estimuladas com LPS. Considerando o teor de TNF- α das células controle não estimuladas como um valor basal dessa citocina nas condições em que se realizam o ensaio, as únicas amostras que foram capazes de reduzir a produção basal dessa citocina anti-inflamatória foram os extratos fermentado e autoclavado, na maior concentração testada, e o *in natura*, nas duas concentrações. Aparentemente, os bioprocessos dos extratos não apresentam vantagens na redução da produção de TNF- α quando a célula não está estimulada a desenvolver processos inflamatórios. No entanto, apesar de estatisticamente significativas, as diferenças de concentrações observadas em cada um dos casos é muito pequena.

Na presença de estímulo inflamatório, o controle é o sobrenadante celular que não foi exposto às amostras, mas que sofreu indução inflamatória por exposição ao LPS. Observa-se que o estímulo inflamatório induzido por LPS foi efetivo, visto que a concentração de TNF- α aumentou em quase 30 vezes em comparação com as células controle não estimuladas.

Em relação aos tratamentos das células estimuladas, observa-se que na concentração de 1 mg/mL dos extratos, todas as amostras reduziram a concentração de TNF- α no sobrenadante celular quando comparadas ao sobrenadante controle. Além disso, todas as amostras foram significativamente iguais entre si. Portanto, nesta concentração as amostras protegeram as células e inibiram a produção de TNF- α na presença do estímulo inflamatório sem distinção na eficácia entre elas.

Na concentração de 0,2 mg/mL as amostras autoclavada e enzimática mostraram maiores reduções nos teores de TNF- α , estatisticamente diferentes do controle. O destaque, com a melhor atuação na inibição desta citocina, foi a amostra biotransformada por reação enzimática.

Rosillo *et al.* (2012) avaliaram a capacidade um extrato de romã enriquecido com ácido elágico em reduzir a inflamação crônica do cólon de ratos induzida por TNBS. Foi verificado que o extrato enriquecido com ácido elágico foi capaz de bloquear a ativação de NF-kB através da inibição I κ B- α pelo método de Western blot. Os pesquisadores analisaram também as concentrações de TNF- α por kits ELISA e observaram que com o ácido elágico a concentração desta citocina reduziu significativamente. Os autores referem que como a ativação de NF-kB promove o aumento da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias,

incluindo TNF- α , a inibição da via NF- κ B ocorrida no presente estudo reduziu a concentração do TNF- α . O mesmo pode ter ocorrido no presente estudo, visto que ambas as amostras possuem ácido elágico. O fato de o extrato fermentado ter evidenciado maior capacidade de redução de TNF- α pode ser justificado pela maior concentração de ácido elágico, que foi cerca de 190 vezes mais que no extrato enzimático, segundo as análises feitas anteriormente por Madeira *et al.* (2014). Li *et al.* (2015) analisaram a inibição da maturação de células dendríticas pela naringenina em animais com artrite induzida por colágeno. O resultado mostrou que a naringenina suprimiu a maturação de células dendríticas e reduziu a secreção de TNF- α nas células retiradas do baço dos animais estimuladas com LPS. Os autores justificam o resultado através do exemplo de que outro flavonóide denominado quercetina também suprimiu a maturação de células dendríticas, a produção de citocinas e a estimulação de células T através da inibição da ativação da via do NF- κ B. A via de inibição do NF- κ B é uma das mais citadas nos artigos quando existe uma ação anti-inflamatória. Pelo fato dela ser tão presente em ações anti-inflamatórias realizadas por compostos fenólicos, pode ser que as amostras deste estudo funcionem pela mesma via, inibindo o NF- κ B.

Park *et al.* (2013b) também estudaram a modificação enzimática de *Citrus* maduros (*C. unshiu*) pelas enzimas glucanotransferase e hesperidinase e verificaram a sua atuação na inflamação no fígado em animais que consumiram etanol. Os extratos que sofreram modificação enzimática foram mais eficientes em reduzir a produção do TNF- α comparados com o extrato que não teve a ação das enzimas. Durante o tratamento enzimático houve a produção de compostos agliconas como a hesperetina. Os autores justificaram que os extratos enzimáticos apresentaram maiores reduções da produção TNF- α porque essas amostras possuíam compostos agliconas, que são mais biodisponíveis, ou seja, são melhores absorvidos no intestino podendo atuar de forma mais eficaz na cascata inflamatória. Entretanto, no presente estudo não houve diferença em relação a redução do TNF- α entre as amostras tratadas, como o extrato fermentado e o enzimático, com as amostras não tratadas, autoclavado e *in natura*. Então no parâmetro de redução do TNF- α , a biodisponibilidade dos extratos não interferiu no resultado, levando a compreensão de que a bioatividade destes extratos é maior por outras causas que devem ser melhor investigadas.

6.8 Concentração de interleucina 6 (IL-6)

A Tabela 7 apresenta o conteúdo de IL-6 no sobrenadante celular expresso em pg/mL, com e sem estímulo inflamatório, nas concentrações de 0,2 e 1 mg/mL dos extratos estudados.

Tabela 7 – Concentração de interleucina 6 (IL-6) (pg/mL) no sobrenadante de cultivo celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após a exposição das amostras.

Estímulo inflamatório	Concentração extrato (mg de amostra/mL)	Concentração de IL-6 (pg/mL) em cada tratamento celular				
		Fermentado	Autoclavado	Enzimático	<i>In natura</i>	Controle
Ausente	0,2	3,05±2,22 ^a	1,21±1,18 ^a	1,60±0,26 ^a	10±1,31 ^{b*}	2,26±0,01
	1,0	3,84±4,07 ^a	0,94±0,39 ^a	2,52±0,92 ^a	11,73±0,39 ^{b*}	
Presente	0,2	638,46±57,69 ^a	796,15±107,69 ^{a*}	919,23±176,92 ^{a*}	650±23,07 ^a	526,07±44,86
	1,0	173,35±26,50 ^{a*}	223,31±23,15 ^{a*}	820,15±72,36 ^{b*}	530,76±80,76 ^c	

Estímulo inflamatório avaliado pela presença ou ausência de lipopolissacarídeos. Valores expressos como média ± desvio padrão. O teste Tukey comparou médias de diferentes amostras na mesma concentração. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Valores identificados com * são considerados estatisticamente diferentes do controle pelo teste de Dunnet.

Na ausência de estímulo inflamatório, o controle é o sobrenadante celular que não foi exposto às amostras e, o valor dele representa a concentração de IL-6 que a célula produziu sem nenhum tipo de intervenção. Portanto, constata-se que as células mesmo sem estímulo, nas condições a que são submetidas no ensaio, são capazes de produzir mediadores inflamatórios como o IL-6, apesar de fazerem isso em baixas concentrações.

O extrato enzimático teve uma menor concentração de IL-6 que o *in natura*. O extrato *in natura* foi a única amostra que teve diferença significativa do sobrenadante controle, entretanto essa diferença não foi obtida pela redução do IL-6 e sim pelo aumento desse mediador no sobrenadante com essa amostra. Na concentração de 0,2 mg/mL, nenhuma amostra apresentou alteração no teor de IL-6 basal produzido pelos macrófagos nas condições do ensaio.

Na presença de estímulo inflamatório, o controle é o sobrenadante celular que não foi exposto às amostras, mas que sofreu indução inflamatória por exposição ao LPS. Observa-se que o estímulo inflamatório induzido por LPS foi efetivo, visto que a concentração de IL-6 aumentou em cerca de 200 vezes quando existiu esse estímulo.

Nas células estimuladas e tratadas com 1 mg/mL dos extratos, o extrato fermentado e seu controle autoclavado não apresentaram diferença significativa entre si, mas tiveram redução significativa da produção de IL-6 quando comparados ao controle celular, especialmente o extrato fermentado, com uma redução de cerca de 3 vezes na concentração de IL-6 produzida.

Na menor concentração testada, de 0,2 mg/mL, as amostras não apresentaram nenhum efeito significativo em relação ao controle. A exceção esteve no extrato enzimático, que elevou a concentração de IL-6 produzida pelo macrófago em relação as células sem tratamento. No entanto, observa-se que os desvios padrão dessas amostras são elevados, mostrando falta de precisão na obtenção dos resultados experimentais, tornando difícil concluir se a amostra realmente teve efeito pró-inflamatório, ou nenhum efeito real. Sabe-se que este tipo de ocorrência é relativamente comum em ensaios de ELISA.

Na concentração de 1 mg/mL, na ausência do estímulo inflamatório, o extratos fermentado e autoclavado não tiveram diferença significativa da concentração de IL-6 em relação ao sobrenadante controle. Estas mesmas amostras foram as que reduziram as concentrações do TNF- α nesta mesma concentração. Portanto, nesse ensaio não foi possível observar relação entre a modulação das concentrações de TNF- α e as concentrações de IL-6. Da mesma forma, a intervenção com o extrato enzimático resultou na manutenção da concentração basal de IL-6 igual ao sobrenadante controle, e com aumento da concentração

de TNF- α . Portanto, também não foi possível observar a correlação entre a concentração de IL-6 e a concentração de TNF- α para essa amostra. Na menor concentração das amostras, o padrão das respostas obtidas seguiu o mesmo. Podemos observar que na concentração de 0,2 mg/mL na ausência de estímulo, observa-se a manutenção dos teores basais de TNF- α e IL6 após o tratamento com os extratos: fermentado, autoclavado e enzimático. Apenas o extrato *in natura* aumentou a concentração tanto do TNF- α como do IL-6 nestas condições.

Aparentemente, as concentrações dessas citocinas pró-inflamatórias produzidas por essa linhagem de macrófagos nas condições normais de cultivo, sem nenhum estímulo diferente, são muito reduzidas, e pouco influenciadas pela exposição aos extratos, que de forma geral, se mostraram inócuos nas concentrações testadas nas células. Quaisquer variações observadas nas concentrações das citocinas nessas condições, não parecem realmente relevantes, quer seja na redução ou estímulo da produção dos sinalizadores protéicos.

Já nas células estimuladas às condições inflamatórias pela presença de LPS, o cenário é bem diferente. Nas concentrações de 1 mg/mL das amostras, os extratos fermentado e autoclavado exibiram uma redução significativa de IL-6 em relação ao sobrenadante do controle e foram as que apresentaram também redução significativa dos teores de TNF- α . Pelo fato da IL-6 ser produzida por outras citocinas, como TNF- α , uma menor produção do TNF- α induziria uma menor produção da IL-6. Visto que, os extratos fermentado e autoclavado apresentaram uma redução na concentração das duas citocinas, essas amostras agiram de acordo com a sequência da via inflamatória, apresentando um mecanismo anti-inflamatória muito interessante.

O extrato enzimático ocasionou redução da concentração do TNF- α , mas não teve redução significativa da IL-6. O extrato *in natura* também levou a redução significativa do TNF- α , mas não do conteúdo de IL-6. Portanto, nesta concentração com a presença de estímulo, as células com o extrato enzimático e o extrato *in natura* produziram IL-6 independente da concentração de TNF- α .

Na menor concentração das amostras, 0,2 mg/mL, não se observou alteração estatisticamente significativa nas concentrações de IL-6 no tratamento com nenhuma das amostras, com exceção do extrato autoclavado e do enzimático, que apresentaram aumento no teor da citocina. Nesta concentração, as células tratadas com o extrato autoclavado e enzimático não dependeram da modulação da concentração de TNF- α para a produção de IL-6, visto que, essas amostras causaram um aumento na concentração de IL-6 e redução da

concentração de TNF- α produzida. Este fato pode-se ser justificado por alguma falha experimental neste ponto específico na avaliação do IL-6, visto que o conteúdo desta citocina depende da concentração de TNF- α , devendo existir mais estudos para investigar essa correlação com os extratos desta pesquisa.

Observa-se que talvez a avaliação do IL-6 em diferentes tempos de exposição das células aos extratos fizesse diferença, visto que no presente estudo as amostras e o estímulo inflamatório foram adicionados praticamente juntos. Lampiasi e Montana (2016) investigaram a modulação do ácido ferúlico na expressão da IL-6 em células ativadas por LPS. Os autores observaram que a adição das amostras 1 hora antes do estímulo inflamatório foi eficaz em modular a concentração de IL-6. Portanto, avaliar a concentração de IL-6 em diferentes tempos de exposição às amostras seria interessante.

Edmunds *et al.* (2011) estudaram a capacidade dos extratos de Kiwi em suprimir a produção de citocinas por macrófagos ativados por lipopolissacarídeos. As concentrações de IL-6 foram reduzidas em todos os extratos analisados, entretanto os extratos com acetato de etilo foram mais eficazes em suprimir a produção de IL-6 que os extratos aquosos de kiwi. Os autores referem que a maior capacidade em reduzir IL-6 pelos extratos de acetato de etilo pode estar relacionada com a maior concentração de polifenóis nesses extratos. O mesmo ocorreu no presente estudo, visto que o extrato que obteve maior redução de IL-6 foi o que possuía maior concentração de fenólicos, que foi o extrato fermentado.

Molina, Bolin e Otton (2015) estudaram a capacidade dos polifenóis do chá verde de alterar o perfil das citocinas inflamatórias em ratos magros e obesos. Os autores determinaram que a concentração de IL-6 foi reduzida tanto nos ratos magros como nos obesos, que receberam o extrato de chá verde. Os pesquisadores explicaram que a redução da IL-6 ocorreu através da inibição da sinalização do *Toll-like* 4 (TLR-4) pelos extratos, evidenciada por níveis reduzidos de ARNm deste receptor. Visto que, o TLR-4 se liga aos lipopolissacarídeos, ativando o NF- κ B e aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, a sua inibição realiza o caminho inverso, reduz a secreção da IL-6. Fato este que pode justificar a redução da IL-6 pelos extratos fermentado e autoclavado, entretanto, para ser realmente comprovado necessita-se de uma análise como RT-PCR para identificar os níveis de ARNm de TLR-4.

Park *et al.* (2013a) analisaram a influência do extrato da casca de *citrus* (*Mikan Marcorv*) produzido na Coreia na inflamação, hiperglicemia e esteatose hepática em animais db / db. Os autores verificaram que houve redução da concentração de IL-6 nos animais que

receberam o extrato etanólico de *Mikan*. O mesmo observa-se em nosso estudo, pois os extratos etanólicos que sofreram tratamento tiveram uma maior redução da concentração do IL-6.

Puuponen-Pimiä *et al.* (2016) estudaram a bioatividade de amoras silvestres (*Rubus chamaemorus*) biotransformadas por processo fermentativo em células de macrófagos J774. A fermentação ocorreu pelo microrganismo *Pediococcus pentosaceus*, depois foram produzidos extratos de acetona e através de análise de HPLC eles detectaram os seguintes fenólicos: ácido elágico, ácido benzóico, elagitaninos, ácidos hidroxicinâmicos como o ácido ferúlico e ácido cafeico. Durante o processo de fermentação observaram que houve acúmulo de ácido elágico e degradação simultânea dos elagitaninos pelo microrganismo. O mesmo pode ser observado no presente estudo, pois segundo a caracterização das amostras feita por Madeira *et al.* (2014), no processo de biotransformação fermentativa também houve acúmulo de ácido elágico no extrato. Nossos resultados indicam que houve redução significativa na concentração de ON e de IL-6 em células tratadas com as amostras fermentadas e, a maior concentração de ácido elágico no extrato fermentado que no extrato autoclavado foi um ponto levantado na caracterização das amostras e que poderia justificar essa diferença na ação anti-inflamatória. Ainda não conseguimos identificar os compostos fenólicos responsáveis pela redução dos marcadores inflamatórios nas amostras geradas entretanto, em geral, observamos que o processo fermentativo provou ser uma fonte potente para gerar compostos bioativos.

6.9 Concentração de interleucina 10 (IL-10)

A Tabela 8 apresenta os resultados em pg/mL do conteúdo de IL-10 no sobrenadante celular com e sem estímulo inflamatório nas concentrações das amostras de 0,2 e 1 mg/mL.

Tabela 8 – Concentração de interleucina 10 (IL-10) (pg/mL) no sobrenadante de cultivo celular, na presença ou ausência de estímulo inflamatório, após à exposição das amostras.

Estímulo inflamatório	Concentração extrato (mg de amostra/mL)	Concentração de IL-10 (pg/mL) em cada tratamento celular				
		Fermentado	Autoclavado	Enzimático	<i>In natura</i>	Controle
Ausente	0,2	22,46±7,57 ^{a*}	30,46±24,48 ^{a*}	9,8±6,00 ^{a*}	19,8±4,00 ^{a*}	266,8±21,00
	1,0	13,13±6,11 ^{a*}	12,53±12,91 ^{a*}	15,86±13,88 ^{a*}	23,13±11,01 ^{a*}	
Presente	0,2	115,8±42,75 ^a	8,46±27,15 ^{b*}	17,8±12,49 ^b	66,46±27,15 ^{a,b}	51,13±21,93
	1,0	56,46±35,79 ^{a,b}	59,8±39,34 ^{a,b}	9,8±2,00 ^a	111,8±43,03 ^b	

Estímulo inflamatório avaliado pela presença ou ausência de lipopolissacarídeos. Valores expressos como média ± desvio padrão. O teste Tukey comparou médias de diferentes amostras na mesma concentração. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey. Valores identificados com * são considerados estatisticamente diferentes do controle pelo teste de Dunnett.

Na ausência de estímulo inflamatório, o controle é o sobrenadante celular que não foi exposto às amostras e, o valor dele representa a concentração de IL-10 que a célula produziu sem amostra. Portanto, constata-se que as células RAW 264,7 são capazes de produzir IL-10 pelo fato de existir uma concentração desta citocina no sobrenadante controle.

Na ausência de estímulo inflamatório na concentração de 1 mg/mL, o extrato fermentado não teve diferença do seu controle, o extrato autoclavado. O extrato fermentado não demonstrou diferença significativa do extrato *in natura*. O extrato enzimático também não teve diferença do extrato *in natura*. Nesta concentração, todas as amostras reduziram a concentração de IL-10 e tiveram diferença significativa em relação ao sobrenadante controle. Considerando que a IL-10 é uma citocina com efeitos anti-inflamatórios, a redução de sua concentração não é um fato considerado bom para a inflamação celular. Na concentração de 0,2 mg/mL sem estímulo inflamatório, o extrato fermentado não teve diferença significativa do seu controle, o extrato autoclavado. O extrato fermentado não apresentou diferença significativa do extrato *in natura*. O extrato enzimático não demonstrou ser estatisticamente diferente do extrato *in natura*. Nesta concentração, todas as amostras reduziram a concentração de IL-10 em relação ao sobrenadante controle, indicando que também na concentração de 0,2 mg /mL as amostras tiveram um efeito negativo em relação ao conteúdo desta citocina anti-inflamatória.

Ao receber estímulo inflamatório, o conteúdo de IL-10 reduziu, constatando que o estímulo foi eficaz em inflamar as células, visto que esta citocina possui efeitos anti-inflamatórios. Portanto, quanto menor a sua concentração maior estado de inflamação nas células.

Na presença de estímulo inflamatório na concentração de 1,0 mg/mL, o extrato fermentado não teve diferença do extrato autoclavado. O extrato fermentado não apresentou diferença estatística do extrato *in natura*. O extrato enzimático teve uma menor concentração de IL-10 que o extrato *in natura*, demonstrando diferença estatística. Nesta concentração, nenhuma amostra foi eficiente em aumentar a concentração de IL-10 em relação ao sobrenadante controle. Portanto nesta concentração, nenhuma amostra teve um potencial anti-inflamatório viável em relação a modulação da produção de IL-10. Na concentração de 0,2 mg/mL, o extrato fermentado demonstrou diferença significativa do seu controle, o extrato autoclavado. O extrato fermentado não apresentou diferença estatística do extrato *in natura*. O extrato enzimático não teve diferença significativa do extrato *in natura*. Nenhuma das

amostras nesta concentração foi eficiente em aumentar a concentração de IL-10 em relação ao sobrenadante controle. Portanto, nesta concentração, as amostras também não tiveram um bom desempenho em relação a liberação de IL-10. Em relação ao tratamento, nenhuma das amostras foi eficaz em aumentar o conteúdo de IL-10 tanto no sobrenadante sem estímulo como com estímulo inflamatório. Pode-se observar com essas respostas, que os efeitos anti-inflamatórios potenciais dessas amostras não se dão pelo estímulo a produção da citocina IL-10, o que não significa que as amostras não tenham papel em outras vias anti-inflamatórias, como a de redução da produção de TNF- α e conseqüentemente de IL-6, como observado nos resultados anteriores.

Liao e Lin (2015) pesquisaram a influência da administração de quercetina e do seu metabólito, quercetina-3- glicosídeo, em animais com inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeos. Os autores adicionaram a quercetina antes da indução inflamatória estimulada por LPS, portanto classificaram esse método como preventivo. Eles verificaram que a quercetina aumentou a concentração de IL-10, sendo significativamente diferente do seu controle, cujo tratamento era composto por apenas LPS. Entretanto, o mesmo não ocorreu no presente estudo, possivelmente o período de adição das amostras foi diferente. As amostras foram adicionadas ao mesmo tempo em que ocorreu o estímulo inflamatório, portanto, não obtivemos informações sobre os efeitos preventivos da inflamação ligados a produção de IL-10 anterior ao estímulo agressivo do LPS.

El-Shitany, El-Bastawissy e El-Desoky (2014) investigaram a influência do tratamento com ácido elágico na inflamação de ratos com edema de pata. Os autores relataram que houve aumento de IL-10 nos sobrenadantes celulares com a adição do ácido elágico. Entretanto, no presente estudo o extrato fermentado e o enzimático com concentrações de ácido elágico detectadas por Madeira (2014), não foram capazes de aumentar as concentrações de IL-10 nos sobrenadantes celulares.

7. CONCLUSÃO

O extrato de fenólicos de resíduos de cítricos biotransformado por processo enzimático foi eficaz em reduzir dois mediadores inflamatórios expressos nas células de macrófagos de murinos, o óxido nítrico e o TNF- α ; evidenciando que mesmo apresentando menores concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante, a amostra foi eficiente em alguns parâmetros inflamatórios. O extrato de fenólicos de resíduos de cítricos biotransformado por processo fermentativo, por ter apresentado maiores concentrações de fenólicos, maior capacidade antioxidante e redução nos dois mediadores inflamatórios estudados (TNF- α e IL-6), mostrou ser o melhor tratamento para os resíduos de *citrus* testado neste trabalho. A biotransformação fermentativa é uma alternativa atraente para se obter um extrato com maior potencial antioxidante e com maior capacidade anti-inflamatória, necessita de poucos recursos para ser realizada, além de fornecer destino mais nobre a esses resíduos de *citrus*. Visto isto, este extrato demonstra ter grande potencial para se tornar um ingrediente funcional ou nutracêutico.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Extração com diferentes solventes das mesmas amostras do presente estudo, principalmente da amostra biotransformada por processo enzimático.
- Análise de Western blotting da proteína iNOS, I κ B- α e do complexo proteico NF- κ B presente na cultura celular com e sem estímulo inflamatório.
- Avaliação da intervenção com os extratos antes do contato das células com o LPS para verificar a ação preventiva das amostras.
- Análise da concentração do IL-6 em diferentes tempos de avaliação após a intervenção com as amostras.
- Avaliar a biodisponibilidade dos extratos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYSINGHE, D. C.; ABEYSINGHE, D. C.; LI, X.; SUN, C.; ZHANG, W.; ZHOU, C.; CHEN, K. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of *citrus* fruit of four species. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p.1338-1344, 2007.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**, v.2, n.1, p.283-318, 1984.

AGÊNCIA PAULISTA PARA INVESTIMENTO E PROMOÇÃO DA COMPETITIVIDADE. Laranja. Disponível em: <http://www.investe.sp.gov.br/setores-de-negocios/agronegocios/laranja/>. Acesso em: 14 mar. 2016.

AGUILAR, C.N.; AGUILAR, C.N.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGAN, L.; RAMÍREZ-CORONEL, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C. Microbial tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.47–59, 2007.

AHMED, L. A; OBAID, A. A. Z.; ZAKI, H. F.; AGHA, A. M. Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: Favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.62, p.161-170, 2014.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.21, n.2, p.143-152, 2013.

AMEER, B.; WEINTRAUB, R. A.; JOHNSON, J.V.; YOST, R.A.; ROUSEFF, R.L Flavone absorption after naringin, hesperidin, and *citrus* administration. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.60, p.34-40, 1996.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemistry**, 1997.

ATAIE-KACHOIE, P.; POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.24, n.2, p.163-173, 2013.

BAE, E.A.; HYUN, Y.J.; CHOO, M.K.; OH, J. K.; RYU, J.H.; KIM, D.H. Protective effect of fermented red ginseng on a transient focal ischemic rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 11, p 1136-1140, 2004.

BALAKRISHNAN, K.; PANDEY, A. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation, **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55, n.5-6, p. 365-372, 1996.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.

BALDWIN, A.S.J. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p.649-83, 1996.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, v.2010, p.1-19, 2010.

BANERJEE, S.; SINGH, S.; RAHMAN, L.U. Biotransformation studies using hairy root cultures- a review. **Biotechnology Advances**,v.30, n.3, p.461-468, 2012.

BARROS, H. R. D. M.; FERREIRA, T. A. P. D. C.; GENOVESE, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of *citrus* from Brazil. **Food Chemistry**, v.134, n.4, p.1892-1898, 2012.

BAUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF- κ B: Ten years after. **Cell**, v.87, p.13-20, 1996.

BELMARES, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; CORONEL, A.R.; AGUILAR, C.N. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v.37, n.8, p.857-864, 2004.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILHO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J. A. Uses and properties of *citrus* flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.12, p.4505–4515, 1997.

BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. **Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v.43, n.3, p.227-235, 1995.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. **New England Journal of Medicine**, v.316, n.7, p.379-385, 1987.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, n.1, p.505-518, 1988.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BONNOTTE, B.; LARMONIER, N.; FAVRE, N.; FROMENTIN, A.; MOUTET, M.; MARTIN M.; MARTIN, M.; GURBUXANI, S.; SOLARY, E.; CHAUFFERTAND, B.; MARTIN, F. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. **The Journal of Immunology**, v.167, n.9, p.5077-5083, 2001.

BOSSY-WETZEL, E.; NEWMAYER, D. D.; GREEN, D. R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. **The EMBO Journal**, v.17, n.1, p.37-49, 1998.

BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; NAVARRO, A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.9, p.1186-1193, 2002.

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

BROOKES, P. S.; LEVONEN, A.-L.; SHIVA, S.; SHIVA, S.; SARTI, P.; DARLEY-USMAR, V.M. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species 1,2. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.6, p.755-764, 2002.

BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.11, p.1440-1450, 2002.

BRUEWER, M.; UTECH, M.; IVANOV, A.I.; HOPKINS, A.M.; PARKOS, C.A.; NUSRAT, A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. **The FASEB Journal**, v.19, p. 923–933, 2005.

BRYNGELSSON, S.; DIMBERG, L. H.; KAMAL-ELDIN, A. Effects of commercial processing on levels of antioxidants in Oats (*Avena sativa L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.7, p.1890-1896, 2002.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.2774-2779, 2001.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.11, p.3337-3340, 2002.

CARVALHO, M. P. **Polpa cítrica: opção econômica e segura para substituir o milho.** Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/bb0026.htm>>. Acesso em: 29 ago 2015.

CASQUETE, R.; CASTRO, S. M.; MARTÍN, A.; RUIZ-MOYANO, S.; SARAIVA, J.A.; CÓRDOBA, M. G.; TEIXEIRA, P. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *citrus* peels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.31, p.37-44, 2015.

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; BARTHELEMY, C.; LIU, Y.-J.; BANCHEREAU, J. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. **International Immunology**, v.6, n.8, p.1177-1185, 1994.

CÉLIZ, G.; RODRIGUEZ, J.; SORIA, F.; DAZ, M. Synthesis of hesperetin 7-O-glucoside from flavonoids extracted from *Citrus* waste using both free and immobilized α -l-rhamnosidases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.3, p.335-341, 2015.

CESAR, T. B.; APTEKMANN, N. P.; ARAUJO, M. P.; VINAGRE, C. C.; MARANHÃO, R. C. Orange juice decreases low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic subjects and improves lipid transfer to high-density lipoprotein in normal and hypercholesterolemic subjects. **Nutrition Research**, v.30, p.689–694, 2010.

CHAMORRO, S.; VIVEROS, A.; ALVAREZ, I.; VEJA, E.; BRENES, A. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. **Food Chemistry**, v 133, n.2, p. 308–314, 2012.

CHEN, Q.; WANG, W.-C.; BRUCE, R.; LI, H.; SCHLEIDER, D. M.; MULBURY, M. J.; BAIN, M. D.; WALLACE, P. K.; BAUMANN, H.; EVANS, S. S. Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-Selectin adhesion by fever-range thermal stress. **Immunity**, v.20, n.1, p.59-70, 2004.

CHEN, Q.; FISHER, D. T.; CLANCY, K. A.; GAUGUET, J.-M. M.; WANG, W.-C.; UNGER, E.; ROSE-JOHN, S.; ANDRIAN, U.H.V.; BAUMANN, H.; EVANS, S. S. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. **Nature Immunology**, v.7, n.12, p.1299-1308, 2006.

CHO, H. J.; SEON, M.R.; LEE, Y.M.; KIM, J.; KIM, J.-K.; KIM, S.G., PARK, J. H.Y. 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. **The Journal of Nutrition**, v.138, n.1, p.17-23, 2008.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J.; DAVOUST, J.; PALUCKA, A.K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nature Immunology**, v.1, n.6, p.510-514, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira. Laranja. Safra 2013/2014. Primeira estimativa.** São Paulo e Triângulo Mineiro, ago. 2013.

COSTA, N. J.; DAHN, C.C; HURREL, F.; TAYLOR, E.R. MURPHY, M.P. Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.5, n.3, p.291-305, 2003.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

DAY, A. J.; DUPONT, M.S.; RIDLEY, M.; RHODES, M.J.; MORGAN, M.R.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Letters**, v.436, n.1, p.71-75, 1998.

D'ARCHIVIO, M.F.C; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v. 43, n.4, p. 384-361, 2007.

DE MORAES CRIZEL, T.; JABLONSKI, A.; DE OLIVEIRA RIOS, A; RECH, R.; FLÔRES, S.H. Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer. **LWT - Food Science and Technology**, v.53, n.1, p.9-14, 2013.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures,

bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, n.14, p.1818-1892, 2013.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.12, p.1744-1756, 2000.

DING, X.; FAN, S.; LU, Y.; ZHANG, Y. GU, M.; ZHANG, L.; GAIGAI, L.; GUO, L.; JIANG, D. LU, X.; LI, Y.; ZHOU, Z.; HUANG, C. *Citrus ichangensis* peel extract exhibits anti-metabolic disorder effects by the inhibition of PPAR γ and LXR signaling in high-fat diet-induced C57BL/6 mouse. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-10, 2012.

DONA, A. M. **Enhancing Antioxidant Activity and Extractability of Bioactive Compounds of Wheat Bran using Thermal Treatments**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - University of Manitoba, Canada. 2011.

DUEÑAS, M.; FERNÁNDEZ, D.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; MUÑOZ, R. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, n.2, p.297-304, 2005.

EDMUNDS, S. J.; ROY, N. C.; LOVE, D. R.; LAING, W.A. Kiwifruit extracts inhibit cytokine production by lipopolysaccharide-activated macrophages, and intestinal epithelial cells isolated from IL10 gene deficient mice. **Cellular Immunology**, v.270, n.1, p.70-79, 2011.

EL-SHITANY, N. A.; EL-BASTAWISSY, E. A. ; EL-DESOKY, K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. **International Immunopharmacology**, v.19, n.2, p.290-299, 2014.

ERLUND, I.; SILASTE, M. L.; ALFTHAN, G.; RANTALA, M.; KESÄNIEMI, Y. A.; ARO, A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human

subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.891-898, 2002.

EU, J. P.; LIU, L.; ZENG, M. An apoptotic model for nitrosative stress. **Biochemistry**, v.39, n.5, p.1040-1047, 2000.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, n.6, p.482-493, 2010.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.475, n.1-2, p.89-111, 2001.

FERREIRA, D.; SLADE, D. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Natural Product Reports**, v.19, n.5, p.517-541, 2002.

FERREIRA, L. R.; MACEDO, J. A.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. **Food Research International**, v.51, n.2, p.526-535, 2013.

FINBLOOM, D. S. ; WINESTOCK, K. D. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. **The Journal of Immunology**, v.155, n.3, p.1079-90, 1995.

FIORENTIN, L. D.; MENON, B. T.; BARROS, S. T. D. D.; PEREIRA, N. C.; LIMA, O. C. M.; MODENES, A. N. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial bagaço de laranja. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.653-659, 2010.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, n.3, p.549-54, 1995.

FUKUCHI, Y.; HIRAMITSU, M.; OKADA, M.; HAYASHI, S.; YUKA, N.; NABENO, Y.; OSAWA, T.; NAITO, M. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by up-regulating

of mRNA levels of the enzymes involved in beta-oxidation in mouse white adipose tissue. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.43, p. 201–209, 2008.

GABOR, M. Flavonoids. Antiinflammatory drugs In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H. (eds). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer Verlag, 1979. p.698.

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

GARCIA-ALONSO, M.; PASCUAL- TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v.84, n.1, p.13-18, 2004.

GARDNER, C. D.; OELRICH, B.; LIU, J.; FELDMAN, D.; FRANKE, A.A.; BROOKS, J.D. Prostatic soy isoflavone concentrations exceed serum levels after dietary supplementation. **The Prostate**, v.69, n.7, p.719-726, 2009.

GHASEMI, K.; GHASEMI, Y.; EBRAHIMZADEH, M. A. Antioxidant activity, phenol e flavonoid contents of 13 *citrus* species peels and tissues. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p.277-281, 2009.

GILMORE, T. D. Introduction to NF-[kappa]B: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v.25, n.51, p.6680-6684, 2006.

GORINSTEIN, S.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PARK, Y.-S.; HARUENKIT, R.; LOJEK, A.; CIZ, M.; CASPI, A.; LIBMAN, I.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of some biochemical characteristics of different *citrus* fruits. **Food Chemistry**, v.74, n.3, p.309-315, 2001.

GOULAS, V.; MANGANARIS, G. A. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of *Citrus* fruits grown in Cyprus. **Food Chemistry**, v.131, n.1, p.39-47, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**, v.50, n.1, p.93-103, 1991.

GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LÖHDEN, M.; CLAUSS, M.; MAXENEIR, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, v.83, n.5, p.793-802, 1995.

GRIFFIN, G. K.; NEWTON, G.; TARRIO, M. L.; BU, D.-X.; MAGANTO-GARCIA, E.; AZCUTIA, V.; ALCAIDE, P.; GRABIE, N.; LUSCINSKAS, F.W.; CROCE, K.J.; LICHTMAN, A. H. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **The Journal of Immunology**, v.188, n.12, p.6287-6299, 2012.

GROUX, H.; BIGLER, M.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M.-G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. **The Journal of Immunology**, v.160, n.7, p.3188-3193, 1998.

GUZIK, T. J.; WEST, N. E. J.; PILLAI, R.; TAGGART, D.P.; CHANNON, K.M. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. **Hypertension**, v.39, n.6, p.1088-1094, 2002.

HA, S. K.; PARK, H.-Y.; EOM, H.; KIM, Y.; CHOI, I. Narirutin fraction from *citrus* peels attenuates LPS-stimulated inflammatory response through inhibition of NF- κ B and MAPKs activation. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.10, p.3498-3504, 2012.

HAMZA, M.; KHOUFI, S.; SAYADI, S. Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. **Food Chemistry**, v.131, n.4, p.1430-1436, 2012.

HART, A.L.; HART, A. L.; AL-HASSI, H. O.; RIGBY, R. J.; BELL, S.J.; EMMANUEL, A.V.; KNIGHT, S.C.; KAMM, M.A.; STAGG, A.J. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.129, p. 50–65, 2005.

HEBA, G.; KRZEMIŃSKI, T.; PORC, M.; GRZYB, J.; RATAJSKA, A.; DEMBINSKA-KIEC, A. The time course of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. **Journal of Vascular Research**, v.38, n.3, p.288-300, 2001.

HEDRICH, C. M.; BREAM, J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunologic research**, v.47, n.1-3, p.185-206, 2010.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.89-143, 2003.

HIRAI, S.; KIM, Y., II; GOTO, T.; KANG, M.S.; YOSHIMURA, M.; OBATA, M.; YU, R.; KAWADA, T. Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Life sciences**, v.81, n. 16, p. 1272–1279, 2007.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed Pharmacother**. v.51, p.305–310, 1997.

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

HORTELANO, S.; ALVAREZ, A. M.; BOSCA, L. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. **The FASEB Journal**, v.13, n.15, p.2311-2317, 1999.

HORTELANO, S.; DALLAPORTA, B.; ZAMZAMI, N.;HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; MARZO, I.; BOSCA, L.; KROEMER, G. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. **FEBS Letters**, v.410, n.2–3, p.373-377, 1997.

HUR, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, Y.-C.; CHOI, I.; KIM, G.-B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v.160, p.346-356, 2014.

HUSSAIN, A.; BOSE, S.; WANG, J.-H.; YADAV, M. K.; MAHAJAN, G.B.; KIM, H. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. **Food Research International**, v.81, p.1-16, 2016.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C.A.; SASNER, J.J. Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1811-1815, 2003.

IGNARRO, L.I. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 53, n. 4, p.503-514, 2002.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, n.4, p.1821-1835, 2011.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letters**, v.364, n.3, p.279-282, 1995.

JAFFREY, S. R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; FERRIS, C. D.; TEMPST, P.; SNYDER, S.H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nature Cell Biology**, v.3, n.2, p.193-197, 2001.

JIAO, P.; CHEN, Q.; SHAH, S.; DU, J.; TAO, B.; TZAMELI, I.; YAN, W.; XU, H. Obesity-related up regulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes. **Diabetes**, v. 58, p. 104-115, 2009.

JONES, S. A.; HORIUCHI, S.; TOPLEY, N.; YAMAMOTO, N.; FULLER, G.M.. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. **The FASEB Journal**, v.15, n.1, p.43-58, 2001.

JOO, S. S.; WON, T. J.; NAM, S. Y.; KIM, Y.B.; LEE, Y.C.; PARK, S.Y.; PARK, H.Y.; HWANG, K.W.; LEE, D.I. Therapeutic advantages of medicinal herbs fermented with *Lactobacillus plantarum*, in topical application and its activities on atopic dermatitis. **Phytotherapy Research**, v.23, n.7, p.913-919, 2009.

JUNG, H.C.; ECKMANN, L.; YANG, S. K.; PANJA, A.; FIERER, J.; MARZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial-cells in response to bacterial invasion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p.55–65, 1995.

JUNG, J.-C.; LIM, E.; LEE, Y.; KANG, J.-M.; KIM, H.; JANG, S.; OH, S.; JUNG, M. Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.8, p.3166-3174, 2009.

JUNG, H. K.; JEONG, Y. S.; PARK, C.-D.; PARL, C.-H.; HONG, J.-H. Inhibitory effect of *citrus* peel extract on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.54, n.2, p.169-176, 2011.

KAMEI, N.; TOBE, K.; SUZUKI, R.; OHSUGI, M.; WATANABE, T.; KUBOTA, T.; OHTSUKA-KOWATARI, N.; KUMAGAI, K.; SAKAMOTO, K.; KOBAYASHI, M.; YAMAUCHI, T.; UEKI, K.; OISHI, Y.; NISHIMURA, S.; MANABE, I.; HASHIMOTO, H.; OHNISHI, Y.; OGATA, H.; TOKUYAMA, K.; TSUNODA, M.; IDE, T.; MURAKAMI, K.; NAGAI, R.; KADOWAKI, T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.36, p.26602-26614, 2006.

KANG, S. R.; PARK, K. I.; PARK, H. S.; LEE, D.H.; KIM, J.A.; NAGAPPAN, A.; KIM, E.H.; LEE, W. S.; SHIN, S.C.; PARK, M. K.; HAN, D. Y.; KIM, G. S. Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. **Food Chemistry**, v.129, n.4, p.1721-1728, 2011.

KANG, S. I.; SHIN, H. S.; KIM, H. M.; HONG, Y. S.; YOON, S. A.; KANG, S. W.; KIM, J. H.; KIM, M. H.; KO, H. C.; KIM, S. J. Immature *Citrus sunki* peel extract exhibits antiobesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.35, n.2, p.223-230, 2012.

KAO, T. H.; HUANG, C. W.; CHEN, B. H. Functional components in *Luffa cylindrica* and their effects on anti-inflammation of macrophage cells. **Food Chemistry**, v.135, n.2, p.386-395, 2012.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-[kappa]B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v.5, n.10, p.749-759, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v.34, p. 637–650, 2011.

KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S.Y.; KIM, H.P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v.58, n.5, p.759-765, 1999.

KIM, D.-O.; LEE, C. Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, n.4, p.253-273, 2004.

KIM, G.-N.; SHIN, J.-G. ; JANG, H.-D. Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis Osbeck*) extract treated with *Aspergillus saitoi*. **Food Chemistry**, v.117, n.1, p.35-41, 2009.

KIM, J. W.; JIN, Y. C.; KIM, Y. M.; RHIE, S.; KIM, H.J.; SEO, H. G.; LEE, J.H.; HA, Y.L.; CHANG, K.C. Daidzein administration *in vivo* reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF-kB activation. **Life Sciences**, v.84, n.7–8, p.227-234, 2009.

KIM, G.; PARK, H.J.; WOO, J.H.; KIM, M.K.; KOH, P.O.; MIN, W.; KO, Y.G.; KIM, C.H.; WON, C.K.; CHO, J.H. *Citrus aurantium* flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.31, p. 1-10, 2012.

KIM, K.-N.; KO, Y.-J.; YANG, H.-M.; HAM, Y.M.; ROH, S.W.; JEON, Y.J.; AHN, G.; KANG, M.C.; YOON, W.J.; KIM, D.; ODA, T. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica L. var. sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF- κ B signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.57, p.126-131, 2013.

KIM, D.-B.; SHIN, G.-H.; KIM, J.-M.; KIM, Y.H.; LEE, J.S.; SONG, H.J.; CHOE, S.Y.; PARK, I.J.; CHO, J.H.; LEE, O.H. Antioxidant and anti-ageing activities of citrus-based juice mixture. **Food Chemistry**, v.194, p.920-927, 2016.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Research & Therapy**, v.8, n. 2, p.1-6, 2006.

KLEJDUS, B.; VACEK, J.; BENEŠOVÁ, L.; KOPECKÝ, J.; LAPČÍK, KUBÁŇ, V. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 7, p.2277-2285, 2007.

KRAAKMAN, M. J.; MURPHY, A. J.; JANDELEIT-DAHM, K.; JANDELEIT-DAHM, K.; KAMMOUN, H.L. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? **Frontiers immunology**, v. 5, p.1- 6, 2014.

KRISHNA, C. Solid-State fermentation systems—an Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, n.1-2, p.1-30, 2005.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins—more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2004, n.5, p.239-240, 2004.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, v.4, n.4, p.471-479, 2005.

KUTTEH, W. H.; RAINEY, W. E.; BEUTLER, B.; CARR, B.R. Tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β production by human fetal kupffer cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.165, n.1, p.112-120, 1991.

LAMAS, S.; PÉREZ-SALA, D.; MONCADA, S. Nitric oxide: from discovery to the clinic. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19, n.11, p.436-438.

LAMPIASI, N.; MONTANA, G. The molecular events behind ferulic acid mediated modulation of IL-6 expression in LPS-activated Raw 264.7 cells. **Immunobiology**, v.221, n.3, p.486-493, 2016.

LANDBO, A.-K.; MEYER, A. S. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.7, p.3169-3177, 2001.

LEE, Y.S.; CHA, B.-Y.; SAITO, K.; CHOI, S.-S.; WANG, X.X.; CHOI, B.-K.; YONEZAWA, T.; TERUYA, T.; NAGAI, K.; WOO, J.-T. Effects of a *Citrus depressa* Hayata (shiikuwasa) extract on obesity in high-fat diet-induced obese mice. **Phytomedicine**, v.18, p. 648–654, 2011.

LI, Y.-R.; CHEN, D.-Y.; CHU, C.-L.; LI, S.; CHEN, Y.K.; WU, C.L.; LIN, C.C. Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n.2, p. 1467-1478, 2015.

LI, B. B.; SMITH, B.; HOSSAIN, M. M. Extraction of phenolics from *citrus* peels: I. Solvent extraction method. **Separation and Purification Technology**, v.48, n.2, p.182-188, 2006.

LIAO, Y.-R.; LIN, J.-Y. Quercetin intraperitoneal administration ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice. **Life Sciences**, v.137, p.89-97, 2015.

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v.134, p.3479S-85S, 2004.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, v. 78, p. S1, 2013.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHACHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v.42, p.145–151, 2008.

MACDERMOTT, R.D. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 31, p. 907-916, 1996.

MACEDO, J. A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M.; L.; MACEDO, G.A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v.126, n.2, p.491-497, 2011.

MACHADO, C. M. M.; OISHI, B. O.; PANDEY, A.; SOCCOL, R. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and Gibberellic Acid Production by Solid-State Fermentation in a Packed-Bed Column Bioreactor. **Biotechnology Progress**, v.20, n.5, p.1449-1453, 2004.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruits. **Fruit Phenolics**. Boca Raton : CRC Press, 1990. Cap. 1, p.1-103.

MADEIRA Jr, J.V.; MACEDO, J.A.; MACEDO, G.A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 102, p.7343-7348, 2011.

MADEIRA Jr, J. V.; NAKAJIMA, V. M.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Rich bioactive phenolic extract production by microbial biotransformation of Brazilian *Citrus* residues. **Chemical Engineering Research and Design**, v.92, n.10, p.1802-1810, 2014.

MADEIRA Jr, J. V. **Tannase production and phenolic compounds obtainment by biotransformation of *Paecilomyces variotii* from citrus residues**. Tese (Doutorado em

Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Univeridade Estadual de Campinas, Campinas. 2014.

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

MAJO, D. D.; GIAMMANCO, M.; GUARDIA, M. L.; TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, S.; FINOTTI, E. Flavanones in *citrus* fruit: structure–antioxidant activity relationships. **Food Research International**, v.38, n.10, p.1161-1166, 2005.

MANN, G. E.; BONACASA, B.; ISHII, T.; SIOW, R.C. Targeting the redox sensitive Nrf2–Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, n.2, p.139-145, 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v.25, n.12, p.677-686, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Citrus**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus> >. Acesso em: 30 out. 2015.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS, I; CASA, C.L.; LASTRA, A.A.D.L. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, attenuates mucosal damage due to colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.481, n. 2–3, p.281-291, 2003.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS, I; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; CA, D.L.L. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **British Journal of Pharmacology**, v.147, n.8, p.873-885, 2006.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 365-373, 2011.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, n.9, p.1995-2000, 2003.

MATSUNO, R.; ARAMAKI, Y.; ARIMA, H.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T.; TSUCHIYA, S. Contribution of CR3 to nitric oxide production from macrophages stimulated with high-dose of LPS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.244, n.1, p.115-119, 1998.

MAXWELL, S.; CRUICKSHANK, A.; THORPE, G. Red wine and antioxidant activity in serum. **The Lancet**, v.344, n.8916, p.193-194, 1994.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunological Reviews**, v.226, n.1, p.219-233, 2008.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, n.9, p.2146-2152, 1997.

MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.1, p. 36-46, 2005.

MIYAKE, T.; SAKURAI, C.; USUDA, M.; FUSUKUMOTO, S.; HIRAMITSU, M.; SAKAIDA, K.; OSAWA, T.; KONDO, K. Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.54, p.54-60, 2006.

MOLINA, N.; BOLIN, A. P.; OTTON, R. Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. **International Immunopharmacology**, v.28, n.2, p.985-996, 2015.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v.19, n.1, p.683-765, 2001.

MORRISON, D.C.; RYAN, J. L. Mechanisms. **Annual Review of Medicine**, v.38, n.1, p.417-432, 1987.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MYTAR, B.; SIEDLAR, M.; WOLOSZYN, M.; RUGGIERO, I.; PRYJMA, J.; ZEMBALA, M. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. **British Journal of Cancer**, v.79, n.5-6, p.737-743, 1999.

NACZK, M.; OICKLE, D.; PINK, D.; SHAHIDI, F. Protein precipitating capacity of Crude Canola Tannins: Effect of pH, Tannin, and Protein Concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.8, p.2144-2148, 1996.

NAGLE, D. G.; FERREIRA, D.; ZHOU, Y.-D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. **Phytochemistry**, v.67, n.17, p.1849-1855, 2006.

NAKAJIMA, V. M.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J.A. *Citrus* bioactive phenolics: role in the obesity treatment. **LWT- Food science and thecnology**, v. 59, n.2, p.1205-1212, 2014.

NAKAZAWA, T.; KAYAMA, M.; RYU, M.; KUNIKATA, H.; WATANABE, R.; YASUDA, M.; KINUGAWA, J.; VAVVAS, D.; MILLER, J.W. Tumor necrosis factor- α mediates photoreceptor death in a rodent model of retinal detachment. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.52, n.3, p.1384-1391, 2011.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion in Immunology**, v.3, n.1, p.65-70, 1991.

NAURATO, N.; WONG, P.; LU, Y.; WROBLEWSKI, K.; BENNICK, A. Interaction of tannin with human salivary histatins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.6, p.2229-2234, 1999.

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**, v. 42, n. 1, p. 29-42, 2003.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.22, n.2, p.83-89, 2011.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants. In: R. HEMINGWAY e P. LAKS (ed.). **Plant Polyphenols**: Springer US, v.59, 1992. Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants, p.539-569. (Basic Life Sciences).

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v.66, n.17, p.2012-2031, 2005.

ORDÁS, I.; MOULD, D.R.; FEAGAN, B.G.; SANDBORN, W.J. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.91, p. 635-646, 2012.

O'ROURKE, R. W. Inflammation in obesity-related diseases. **Surgery**, v.145, n.3, p.255-259, 2009.

PAN, M.-H.; LIN-SHIAU, S.-Y.; LIN, J.-K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF κ B activation in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v.60, n.11, p.1665-1676, 2000.

PANJA, A.; GOLDBERG, S.; ECKMANN, L.; KRISHEN, P.; MAYER, L. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v.161, p. 3675–3684, 1998.

PARK, H.-J.; JUNG, U. J.; CHO, S.-J.; JUNG, H.K.; SHIM, S.; CHOI, M.S. *Citrus* unshiu peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose- and lipid-regulating enzymes in db/db mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n.2, p.419-427, 2013a.

PARK, H.-Y.; CHOI, H.-D.; EOM, H.; CHOI, I. Enzymatic modification enhances the protective activity of *citrus* flavonoids against alcohol-induced liver disease. **Food Chemistry**, v.139, n.1–4, p.231-240, 2013b.

PANTELIDIS, G. E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G. A.; DIAMANTIDIS, G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p.777-783, 2007.

PEDERSEN, J., COSKUN, M.; SOENDERGAARD, C.; SALEM, M.; NIELSEN, O. H. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.1, p. 64–77, 2014.

PERKINS, N. D. The Rel/NF- κ B family: friend and foe. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, n.9, p.434-440, 2000.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W. ; PLESCHER, A.; GATZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.-Y.; HUFFEL, C. V.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in

C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations inTlr4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998.

POT, C.; APETOH, L.; KUCHROO, V. K. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. **Seminars in Immunology**, v.23, n.3, p.202-208, 2011.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.4290-4302, 2005.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v.18, Part B, p.797-810, 2015.

PURI, M.; SHARMA, D., BARROW, C.J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v.30, p.37-44, 2012.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; JUVONEN, R.; KÖSSÖ, T.; TRUCHADO, P.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B.; LEPPÄNEN, T.; MOILANEN, E.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M. Fermentation and dry fractionation increase bioactivity of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). **Food Chemistry**, v.197, Part A, p.950-958, 2016.

RAASMAJA, A.; LECKLIN, A.; LI, X.M.; ZOU, J.; ZHU, G.-G.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. A water-alcohol extract of *Citrus grandis* whole fruits has beneficial metabolic effects in the obese Zucker rats fed with high fat/high cholesterol diet. **Food chemistry**, v. 138, p. 1392-1399, 2013.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R.; QUIJANO, C.; CASTRO, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.11, p.1451-1464, 2002.

RAMALHO, R.; GUIMARÃES, C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crónica associada à obesidade: implicações clínicas. **Acta Medica Portuguesa**, v.21, p.489-496, 2008.

RAO, G.N.; RAO, P.G.P.; BALASWAMY, K.; SATYANARAYANA, A. Antioxidant activity of Stevia (*Stevia rebaudiana L.*) leaf powder and a commercial Stevioside powder. **Journal of Food and Pharmaceutical Sciences**, n. 2, p. 32-38, 2014.

RAPISARDA, P.; BIANCO, M.L.; PANNUZZO, P.; TIMPANARO, N. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis (L.) Osbeck*]. **Postharvest Biology and Technology**, v.49, n.3, p.348-354, 2008.

REDDY, M.B.; COOK, J. D. Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.4, p.723-8, 1991.

REUTER, S.; GRUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.10, p.2866-2887, 2003.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284-289, 2001.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M.A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. *In vitro* bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. **Food Research International**, v.62, p.771-778, 2014.

ROSILLO, M. A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; CÁRDENO, A.; APARICIO-SOTO, M.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; VILLEGAS, I.; CA, D.L.L. Dietary supplementation of an ellagic

acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. **Pharmacological Research**, v.66, n.3, p.235-242, 2012.

SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; GEGINAT, J. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.21, n.5, p.331-344, 2010.

SAKATA, K.; HIROSE, Y.; QIAO, Z.; TANAKA, T.; MORI, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters**, v.199, n.2, p.139-145, 2003

SALEEM, M.; KIM, H.J.; ALI, M.S.; LEE, Y.S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Product Reports**, v.22, n.6, p.696-716, 2005.

SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.15, p.7240-7244, 1993.

SAMMAN, S.; SANDSTRÖM, B.; TOFT, M.B.; BUKHAVE, K.; JENSEN, M.; SORENSEN, S.S.; HANSEN, M. Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.3, p.607-612, 2001.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; DE ANCOS, B.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M. P. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.11, p.4403-4409, 2005.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v.10, n.3, p.170-181, 2010.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073S-85S, 2000.

SCHMIDT, M.I.; DUNCA, B.B.; SHARRETT, A.R.; LINDBERG, G.; SAVAGE, P.J.; OFFENBACHER, S.; AZAMBUJA, M.I.; TRACY, R.P. HEISS, G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults [Atherosclerosis Risk in Communities study]: a cohort study. **Lancet**, v. 353, p.1649-1652, 1999.

SCHREIHOFFER, D. A.; REDMOND, L. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury *in vitro*. **Neuroscience**, v.158, n.2, p.602-609, 2009.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; FERRARI, D.; LOS, M.; WESSELBORG, S.; PETER, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. **European Journal of Biochemistry**, v.254, n.3, p.439-459, 1998.

SERAFINI, M.; GHISELLI, A.; FERRO-LUZZI, A. *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, n.1, p. 28-32, 1996.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.6, p.1003-1007, 1998.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 558 p.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v.18, Part B, p.820-897, 2015.

SHI, B.; QIANG, H.; YAO, K.; HUANG, W.; LI, Q. Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.80, n.10, p.1154-1159, 2005.

SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A. Spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Analytical Biochemistry**, v.279, n.1, p.85-89, 2000.

SHUKLA, S.; METHA, A.; BAJPAI, V.K.; SHUKLA, S. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.9, p.2338-2343, 2009.

SUNDERKOTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M.J.; VAN ROOIJEN, N.; STEHLING, M.; DREVETS, D.A.; LEENEN, P. J. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **The Journal of Immunology**, v. 172, n.7, p. 4410-4417, 2004.

SOTO, M.L.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. **Journal of Food Engineering**, v.105, p.1-27, 2011.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y. Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015.

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T.M; WONG, G.H.; GOEDDEL, D.V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. **Cell**, v.74, n.5, p.845-853, 1993.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.H.; LIN, H.H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v.23, n.1, p.901-944, 2005.

TORRES, P.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J. Regioselective Lipase-Catalyzed Synthesis of 3-O-Acyl Derivatives of Resveratrol and Study of Their Antioxidant Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.2, p.807-813, 2010.

TRACEY, K. J.; FONG, Y.; HESSE, D.G.; MANOQUE, K.R.; LEE, A.T.; KUO, G.C.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v.330, n.6149, p.662-664, 1987.

TREUTTER, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. **Plant Growth Regulation**, v.34, n.1, p.71-89, 2001.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M. L.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D.D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v.104, p.466-479, 2007.

UDENIGWE, C. C.; LU, Y.-L.; HAN, C.-H.; HOU, W.-C.; ALUKO, R. E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. **Food Chemistry**, v.116, n.1, p.277-284, 2009.

VAN HET HOF, K. H.; DE BOER, H.S; WISEMAN, S.A.; LIEN, N.; WESTRATE, J.A.; TIJBURG, L.B. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, n.5, p.1125-32, 1997.

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

XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, n.5, p.576-82, 1994.

XU, C.; YAVUZ, Y.; BOREJSZA-WYSOCKI, W.; LU, J.; GU, L.; RAMÍREZ-RODRIGUES, M.M.; MARSHALL, M.R. Enzyme release of phenolics from muscadine grape (*Vitis rotundifolia Michx.*) skins and seeds. **Food Chemistry**, v.157, p.20-29, 2014.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**, v.10, n.1, p.45-65, 2003.

WALLE, J. V.; HENDRICKX, A.; ROMIER, B.; LARONDELLE, Y.; SCHNEIDER, Y.J. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. **Toxicology *in vitro***, v.24, p. 1441–1449, 2010.

WANG, S. Y.; CHEN, C.T.; SCIARAPPA, W.; WANG, C.Y.; CAMP, M.J. Fruit Quality, Antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.14, p.5788-5794, 2008.

WEBER-NORDT, R. M.; RILEY, J.K.; GREENLUND, A.C.; MOORE, K.W.; DARNELL, J.E.; SCHREIBER, R.D. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the Interleukin-10 receptor Intracellular domain. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.44, p.27954-27961, 1996.

WEHINGER, J. ; GOUILLEUX, F.; GRONER, B.; FINKE, J.; MERTELSMANN, R.; WEBER-NARDT, R.M. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. **FEBS Letters**, v.394, n.3, p.365-370, 1996.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE, A.W.Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, n.12, p.1796-1808, 2003.

WEISBERG, S. P. ; HUNTER, D.; HUBER, R.; JACOB, L.; SLAYMAKER, S.; VADDI, K.; CHARO, I.; LEIBEL, R.; FERRANTE, A.W. Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.1, p.115-124, 2006.

WEST, N. E. J.; QIAN, H.; GUZIC, T.J.; BLACK, E.; CAI, S.; GEORDE, S.E.; CHANNON, K.M. Nitric Oxide Synthase (nNOS) Gene transfer modifies venous bypass graft remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production. **Circulation**, v.104, n.13, p.1526-1532, 2001.

WILMSEN, P. K.; SPADA, D. S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.12, p.4757-4761, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 26 jun. 2015.

WOODFIN, A.; VOISIN, M.-B.; NOURSHARGH, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. **Current opinion in hematology**, v.17, n.1, p.9-17, 2010.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v.249, p. 1431–1433, 1990.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4026-4037, 2004.

YELAVARTHI, K. K.; HUNT, J. S. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor-alpha receptor messenger RNA and protein in human placentas. **The American Journal of Pathology**, v.143, n.4, p.1131-1141, 1993.

YING, X.; YU, K.; CHEN, X.; CHEN, H.; HONG, J.; CHENG, S.; PENG, L. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. **Cellular Immunology**, v.285, n.1–2, p.49-54, 2013.

YOSHIDA, H.; WATANABE, H.; ISHIDA, A.; WATANABE, W.; NARUMI, K.; ATSUMI, T.; SUGITA, C.; KUROKAMA, M. Naringenin suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, n.1, p. 95-101, 2014.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.6, p.454-465, 2007.

ZHANG, M.; CHEN, H.; LI, J.; YING, P.; LIANG, Y. Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, n.1, p.181-185, 2010.

ZHENG, H.-Z.; HWANG, I.-W.; CHUNG, S.-K. Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v.10, n.12, p.912-919, 2009.

ZIGMOND, E.; BERNSHTEIN, B.; FRIEDLANDER, G.; WALKER, C.R.; YONA, S.; KIM, K.W.; BRENNER, O.; VAROL, C.; MÜLLER, W.; JUNG, S.. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. **Immunity**, v.40, n.5, p.720-733, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Curvas padrão empregadas nas análises de compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos

Figura 9.1 – Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação de FT utilizando microplacas de 96 poços.

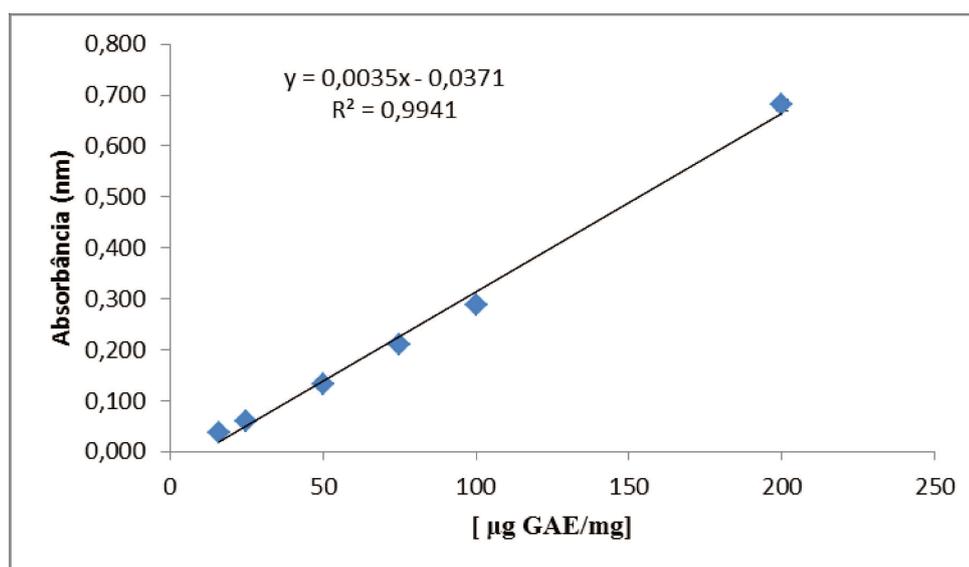


Figura 9.2 – Curva padrão de Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

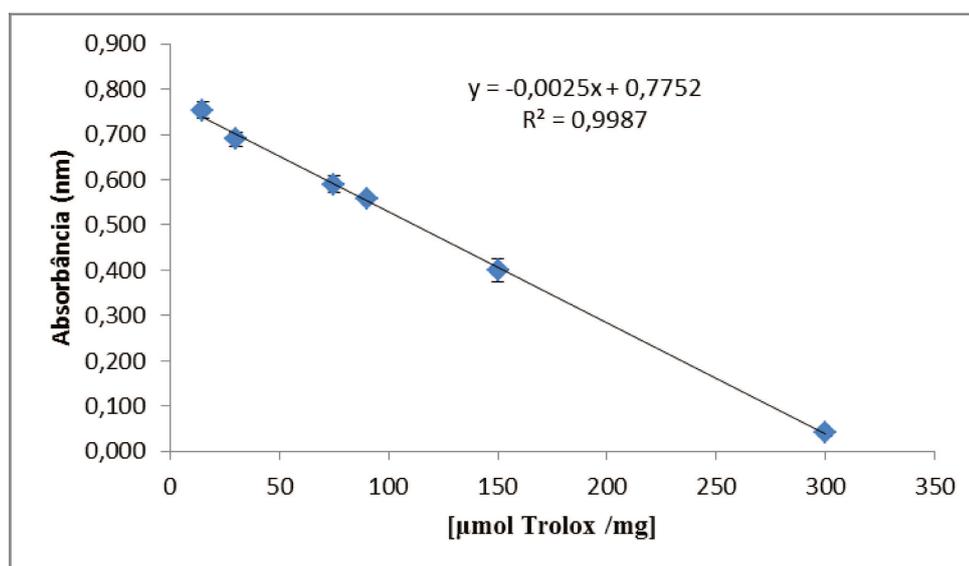
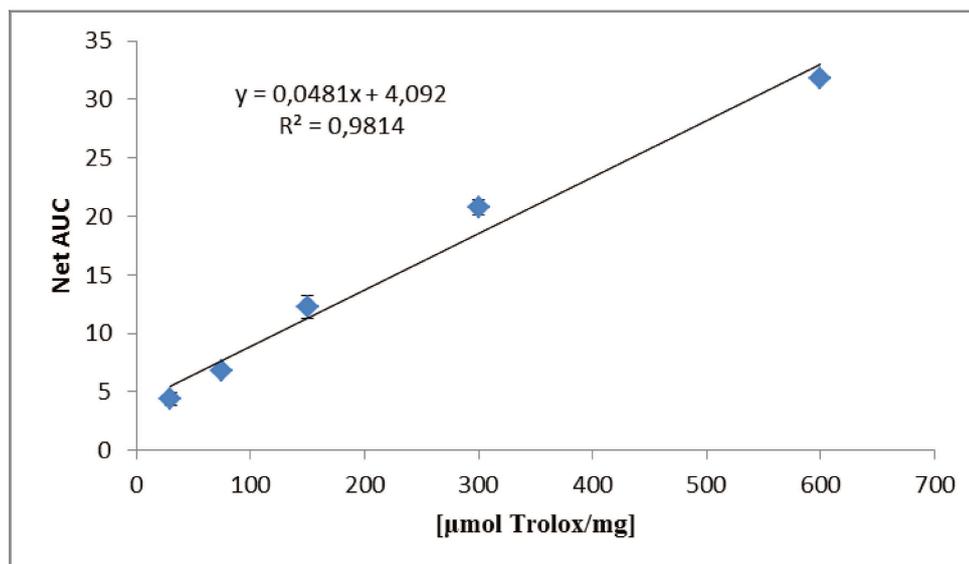


Figura 9.3 – Curva padrão de Trolox para determinação da capacidade antioxidante pelo método ORAC.



APÊNDICE B: Curva padrão dos mediadores inflamatórios: óxido nítrico, TNF- α , IL-6 e IL-10

Figura 9.4 – Curva padrão de óxido nítrico.

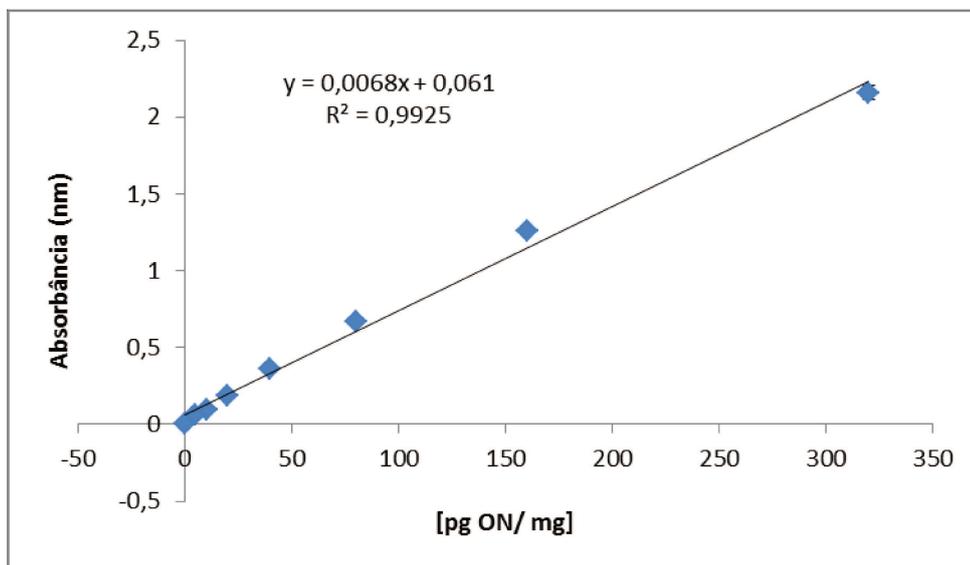


Figura 9.5 – Curva padrão de TNF- α com as amostras com diluição 1:4 sem LPS

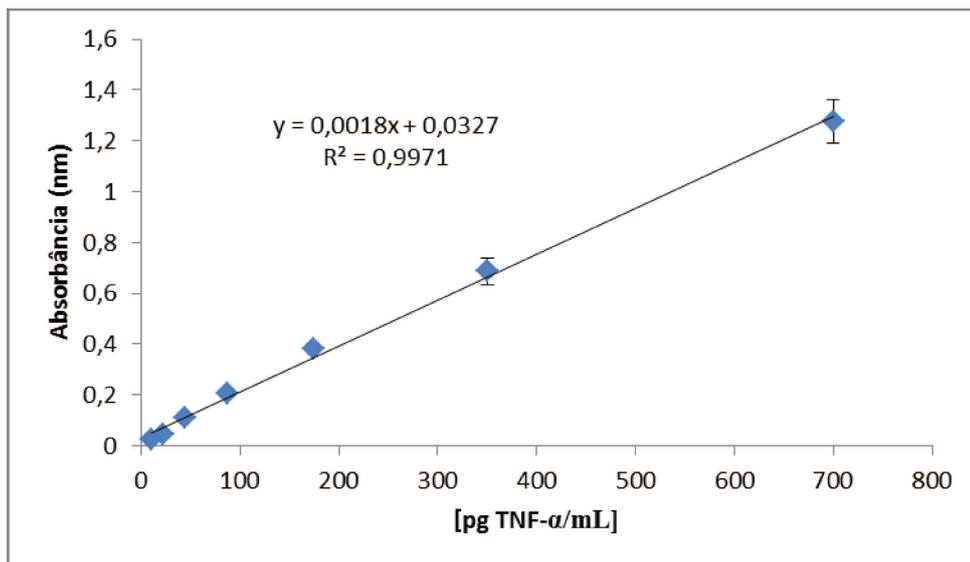


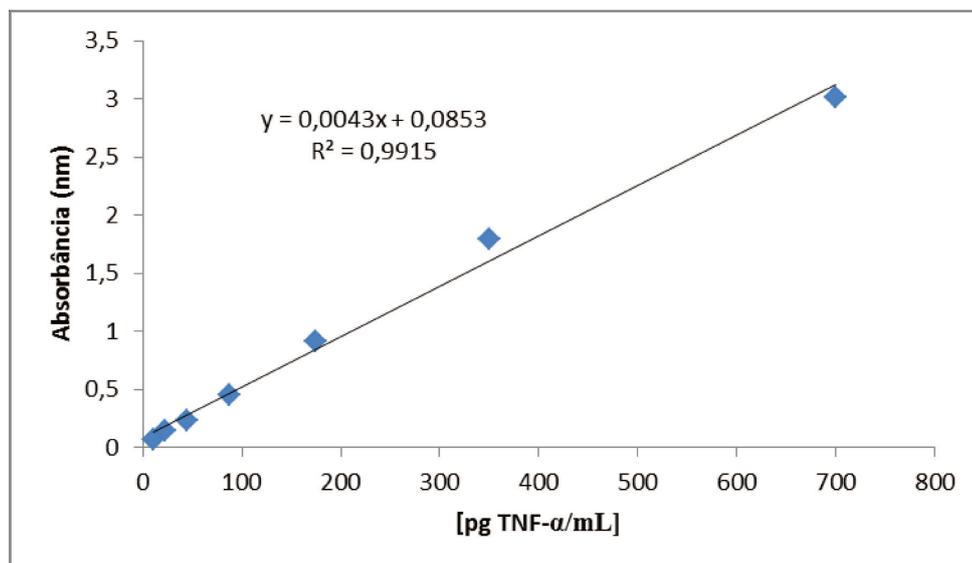
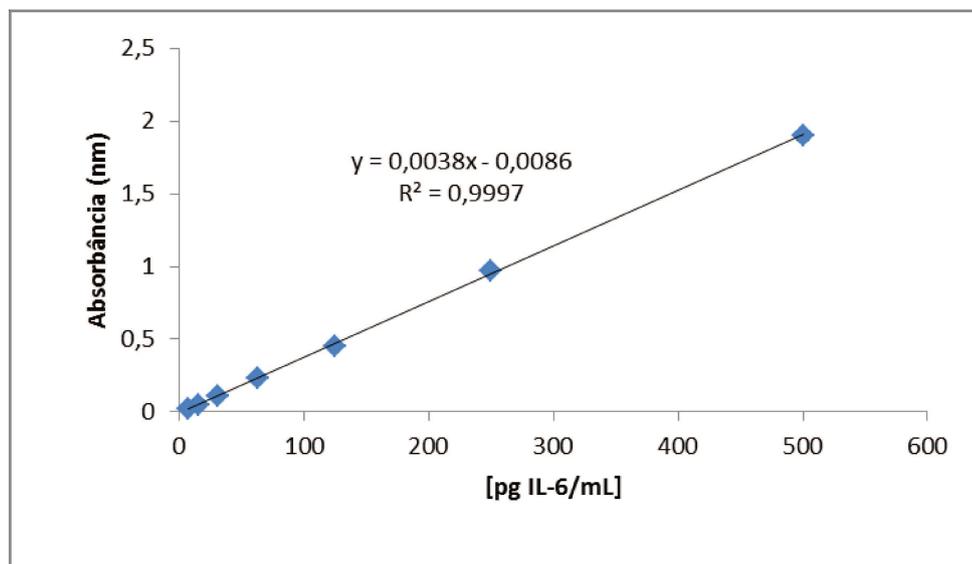
Figura 10.6 – Curva padrão de TNF- α com as amostras com diluição 1:50 com LPS**Figura 9.7** – Curva padrão de IL-6 com as amostras sem diluição com e sem LPS

Figura 9.8 – Curva padrão de IL-6 com as amostras com diluição 1:20 com e sem LPS

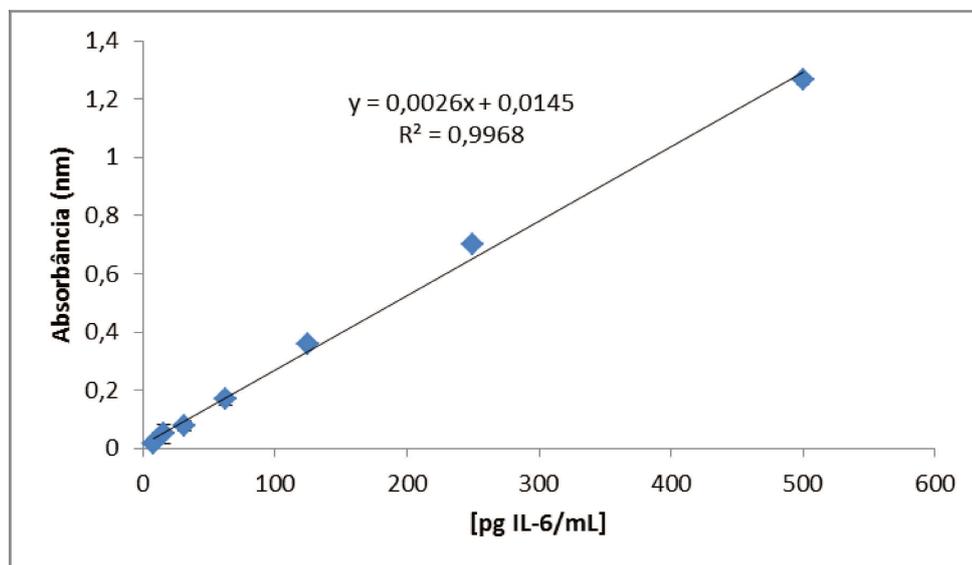


Figura 9.9 – Curva padrão de IL-10 com as amostras sem diluição com e sem LPS

