

TRANSFORMAÇÕES ENZIMÁTICAS DE FLAVONÓIDES

CLAUDIO LIMA DE AGUIAR*
SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**
SIU MUI TSAI***
YONG KUN PARK****

Efetuuou-se revisão da literatura sobre as transformações microbianas ou enzimáticas de flavonóides. Reações enzimáticas, bem como a ação de suspensões microbianas sobre flavonóides foram abordadas em sete tópicos. Os efeitos dessas transformações também foram discutidos para algumas reações. A literatura científica mostra que muitos microrganismos e enzimas apresentam a habilidade de metabolizar flavonóides amplamente distribuídos em vegetais. Estruturas modificadas dos flavonóides têm sido identificadas após culturas microbianas ou reações enzimáticas específicas. Tais alterações nas suas estruturas químicas podem produzir flavonóides com maior atividade biológica (antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e antimicrobiana).

PALAVRAS-CHAVE: FLAVONÓIDES; CONVERSÃO ENZIMÁTICA; TRANSFORMAÇÃO MICROBIANA.

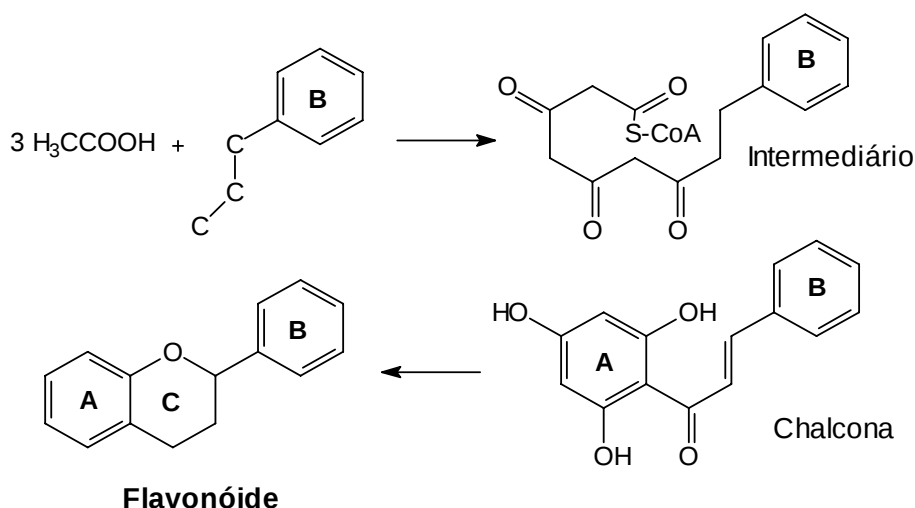
- * Professor, Doutor em Ciência de Alimentos, Fazenda Experimental, Universidade Norte do Paraná, Tamarana, PR, Brasil (e-mail: claguiar@yahoo.com.br).
** Professor, Doutor em Ciência de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.
*** Professora, Doutora em Agronomia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.
**** Professor, Doutor em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos fenólicos amplamente encontrados em tecidos vasculares de plantas, incluindo frutas, pólen, raízes e caules (DI CARLO et al., 1999; PIETTA, 2000; ANDLAUER e FURST, 1998). Com mais de 8000 compostos individuais conhecidos, os flavonóides são biossintetizados pela combinação dos ácidos chiquímico e acilpolimalonato. Um derivado do ácido cinâmico (fenilpropano), sintetizado a partir do ácido chiquímico, age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estrutura (DI CARLO et al., 1999) (Figura 1). As subseqüentes hidroxilações e reduções produzem diferentes formas de flavonóides (PIETTA, 2000).

A estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$) (DI CARLO et al., 1999), sendo dois anéis fenólicos substituídos (**A** e **B**) e um pirano (cadeia heterocíclica **C**) acoplado ao anel A (Figura 2). Os anéis A e B são hidroxilados e podem conter substituintes metoxílicos (HERRMANN, WILLEMS e JANKE, 2001).

FIGURA 1 - BISSÍNTESE DE FLAVONÓIDES

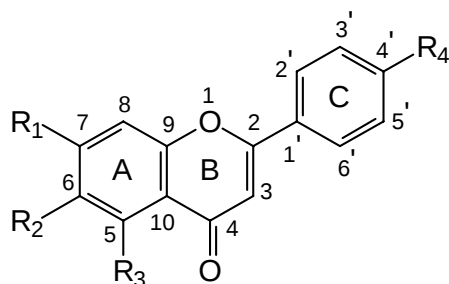


FONTE: DI CARLO et al., 1999.

As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C. Algumas classes de flavonóides de interesse são flavonas (**1**), flavonóis (**2**), flavanonas (**3**), flavan-3-ol (**4**), isoflavonas (**5**), antocianidinas (**6**) e flavanolol (**7**) (Figura 3) (DI CARLO et al., 1999; PIETTA, 2000; PETERSON e DWYER, 1998). Flavonóides geralmente ocorrem em plantas como derivados glicosilados, contribuindo para o brilho do azul, do vermelho e do laranja nas folhas, flores e frutos. Também estão associados com diferentes propriedades biológicas. *Flavanonas* são encontradas predominantemente em frutas cítricas e *flavonas* em ervas aromáticas e grãos de cereais, enquanto *isoflavonas* ocorrem em legumes e sementes oleaginosas (como a soja). *Antocianidinas* e suas formas glicosiladas (*antocianinas*) são pigmentos naturais encontrados em uvas. As *flavan-3-ol* (como as catequinas, epicatequina e seus galato-ésteres) podem ser verificadas em frutas e folhas de chá. Já os *flavonóis* ocorrem em todas as frutas e vegetais (DI CARLO et al., 1999; PIETTA, 2000; PETERSON e DWYER, 1998; PARK et al., 2001abc; CARRÃO-PANIZZI e BORDIGNON, 2000). Tem-se ainda *flavanolol* como a taxifolina, encontrada em frutas cítricas (PIETTA, 2000). Todos esses flavonóides podem ser isolados mediante diferentes técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna

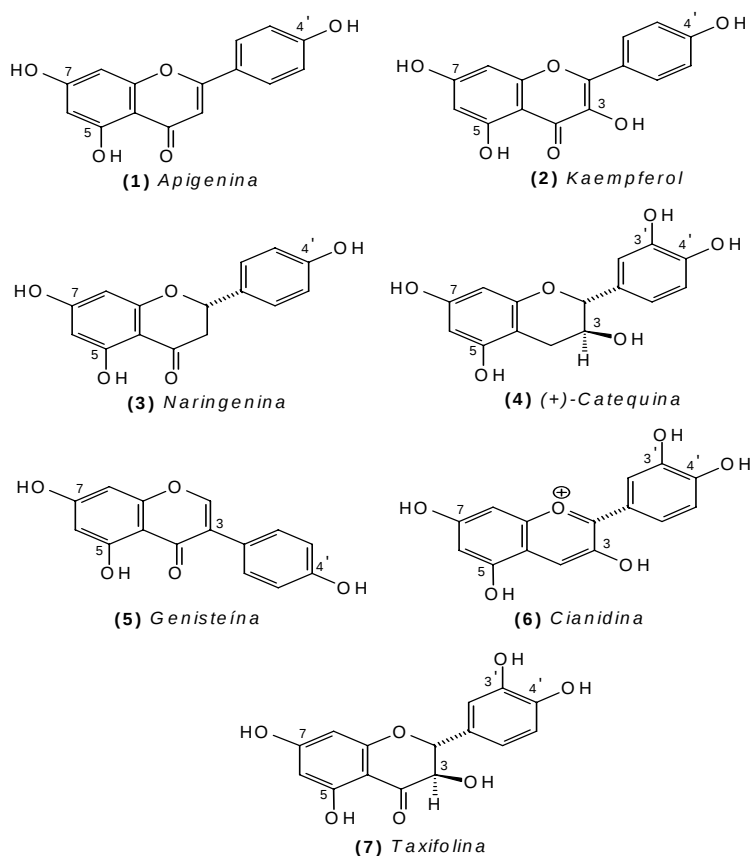
aberta, cromatografia a líquido de alta eficiência, cromatografia em camada delgada de alta eficiência) e identificados por espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear (PARK e LEE, 1996).

FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES



Apesar da abundância de flavonóides em vegetais, o processamento pode diminuir seu conteúdo em até 50% pela lavagem ou remoção de partes da planta. Tais compostos também estão sujeitos a modificações químicas e enzimáticas de suas estruturas.

FIGURA 3 - ESTRUTURAS DE ALGUMAS CLASSES DE FLAVONÓIDES



A presente revisão teve como objetivo discutir algumas das transformações enzimáticas ocorridas com flavonóides, principalmente devido à sua importância para a indústria farmacêutica e para a indústria de alimentos (setor de nutracêuticos).

2 TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS E ENZIMÁTICAS

Muitos microrganismos são capazes de metabolizar flavonóides e suas estruturas modificadas têm sido encontradas. Flavonóides podem ser transformados por diferentes reações, sendo que hidroxilação, metilação, glicosilação e acetilação ocorrem com quase todas as classes de flavonóides. Reações como, sulfatação e prenilação, são mais restritas a certos grupos de flavonóides (HELLER e FORKMANN, 1988). O Quadro 1 lista algumas transformações microbianas de acordo com o flavonóide.

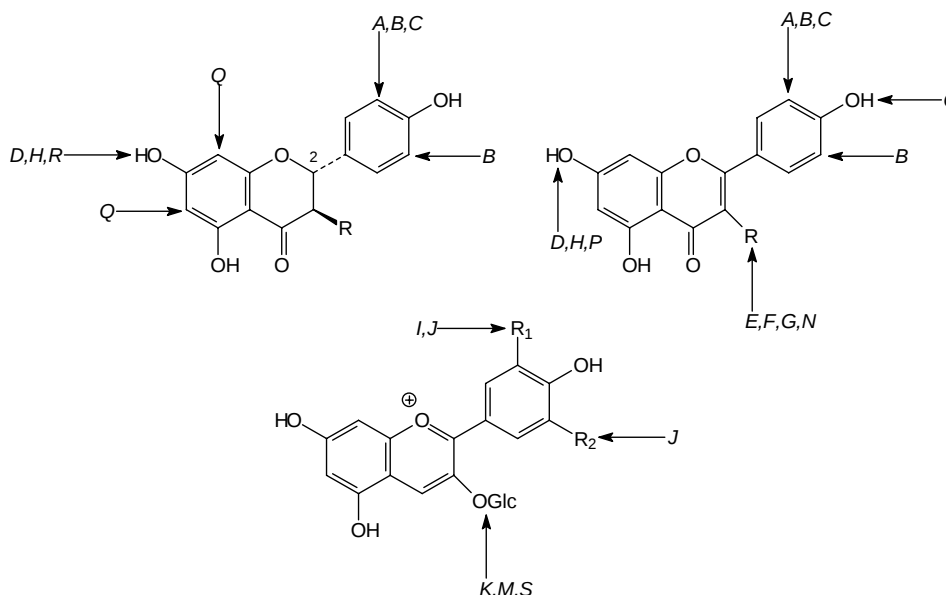
QUADRO 1 - TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS DE FLAVONÓIDES

Substrato	Organismo	Produto	Referências
Isoflavona	<i>Gongronella butleri</i>	4'-hidroxiiisoflavona	DEWICK (1993)
Isoflavona	<i>Aspergillus niger</i>	3',4'-dihidroxiiisoflavona	
Biochanina A	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Genisteína	
2,3-dehidrokievitona	<i>Aspergillus flavus</i>	Lunatona	
2,3-dehidrokievitona	<i>Botrytis cinerea</i>	Lunatona	
Angustona A	<i>Aspergillus flavus</i>	Lupiniisoflavona F	
Angustona A	<i>Aspergillus flavus</i>	Lupiniisoflavona N	
Isoflavanona	<i>Absidia blakesleeana</i>	4'-hidroxiiisoflavanona	
Isoflavanona	<i>Absidia blakesleeana</i>	6,4'-dihidroxiiisoflavanona	
Isoflavanona	<i>Aspergillus niger</i>	Isoflavona	
Isoflavanona	<i>Aspergillus niger</i>	3',4'-dihidroxiiisoflavona	
Isoflavanona	<i>Aspergillus niger</i>	2-hidroxiiisoflavanona	
Medicarpina	<i>Ascochyta rabiei</i>	Demetilmedicarpina	
Medicarpina	<i>Ascochyta rabiei</i>	Vestitol	
Medicarpina	<i>Ascochyta rabiei</i>	Demetilvestitol	
Medicarpina	<i>Ascochyta rabiei</i>	7,2'-dihidroxii-4'-metoxi-isoflav-3-eno	
Medicarpina	<i>Nectria haematococca</i>	6a-hidroximedicarpina	
Maackiaina	<i>Ascochyta rabiei</i>	7,2'-dihidroxii-4',5'-metileno-dioxiiisoflavona	
Edunol	<i>Aspergillus flavus</i>	Neorautanol	
Pisatina	<i>Nectria haematococca</i>	6a-hidroximaackiaina	
Daidzina	<i>Bifidobacterium</i> sp. Int-57	Daidzeína	JEON, JI e KWANG (2002)
Genistina	<i>Bifidobacterium</i> sp. Int-57	Genisteína	AGUIAR (2004)
Daidzina	<i>Aspergillus oryzae</i>	Daidzeína	
Genistina	<i>Aspergillus oryzae</i>	Genisteína	TANAKA, MIZUTANI e TAHARA (1996)
Isoflavona prenilada	<i>Botrytis cinerea</i>	Dihidropirano e dihidrofurano isoflavona	
Daidzeína	<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 4206	Shoyuflavona A	KINOSHITA, MURAKAMI e AISHIMA (2000)
Genisteína	<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 4206	Shoyuflavona B	
Rutina	Bactérias metanogênicas	Quercetina	HERRMANN, WILLEMS e JANKE (2001)
Hesperidina	Bactérias metanogênicas	Hesperitina	
Quercetina	Bactérias metanogênicas	3,4-dihidroxifenilacetato Floroglicinol	
Hesperitina	Bactérias metanogênicas	4-hidroxii-3-metoxifenilpropionato Floroglicinol	
Naringenina	<i>Cunninghamella elegans</i>	Naringenina-7-sulfato	IBRAHIM (2000)
Genisteína	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp.	5,6,7,4'-tetrahidroxiiisoflavona 5,8,4'-tetrahidroxiiisoflavona	KLUS e BARZ (1998)
Biochanina A	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp.	4'-metoxi-5,7,8-triidroxiiisoflavona	
Biochanina A	<i>Micrococcus</i> sp.	4'-metoxi-5,6,7-triidroxiiisoflavona	
Gliciteína	<i>Brevibacterium epidermides</i> <i>Micrococcus luteus</i>	6,7,4'-triidroxiiisoflavona	KLUS, BÖRGER-PAPENDORF e BARZ (1993)
Glicosil-isoflavonas	<i>Lactobacillus case</i>	Isoflavonas agliconas	MATSUDA et al. (1992)
Rutina	<i>Penicillium rugulosum</i> IFO 7242	Quercetina	NARIKAWA et al. (1998)

As transformações microbianas de flavonóides ocorrem com frequência e podem gerar produtos com maior interesse que seus precursores. Essas transformações estão associadas com diferentes enzimas (de origem microbiana ou vegetal), ou ao metabolismo humano. São capazes de transformar os flavonóides utilizando diversos intermediários de sua biossíntese, bem como alguns produtos finais

(flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas). As enzimas exibem, em geral, altas especificidades pelo substrato, o que implica num número definido de reações. Algumas das enzimas envolvidas nas transformações de flavonóides são apresentadas na Figura 4.

FIGURA 4 - ESQUEMA DAS POSIÇÕES DE MODIFICAÇÕES FREQUENTES OBSERVADAS EM FLAVONÓIDES

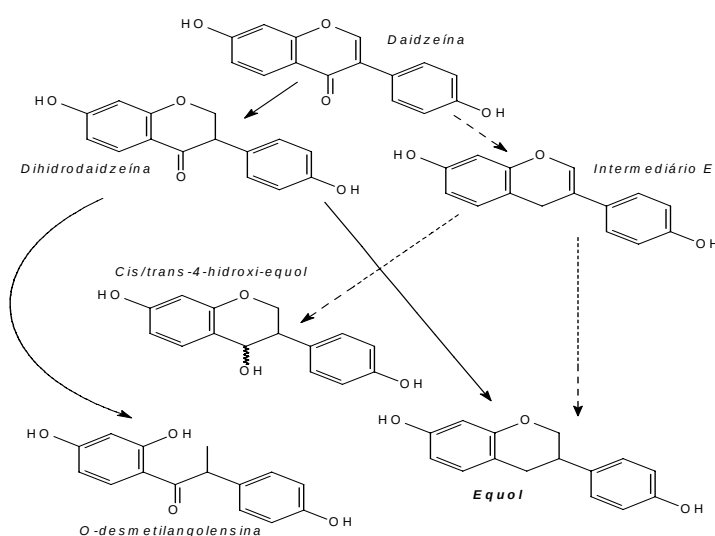


Enzimas: (A) flavonóide 3'-hidroxilase, (B) flavonóide 3',5'-hidroxilase, (C) flavonóide 3'-O-metiltransferase, (D) flavonóide 7-O-glicosiltransferase, (E) flavonol 3-O-glicosiltransferase, (F) flavonol 3-O-metiltransferase, (G) flavonol 3-O-glicosil-6''-maloniltransferase, (H) flavonóide 7-O-glicosil-6''-maloniltransferase, (I) antocianidina 3'-O-metiltransferase, (J) antocianidina 3',5'-O-metiltransferase, (K) antocianidina 3-O-glicosiltransferase, (L) antocianidina 3-O-glicosil-5-O-glicosiltransferase, (M) antocianidina 3-O-glicosil-aciltransferase, (N) flavonol 3-O-sulfotransferase, (O) flavonol 4'-O-sulfotransferase, (P) flavonol 7-O-sulfotransferase, (Q) 2-hidroxi-flavanona-C-glicosiltransferase, (R) flavanona 7-O-glicosil-2''-O-ramnosiltransferase e (S) antocianidina 3-glicosil-aciltransferase.

FONTE: NARIKAWA et al., 1998.

Estima-se que o consumo de flavonóides na dieta humana esteja entre 23 a 1000 mg/d, mas não existe estimativa precisa do consumo de todos os flavonóides numa dieta tradicional (DI CARLO et al., 1999; ANDLAUER e FÜRST, 1998). A maneira de absorção dos flavonóides varia e suas vias metabólicas não são totalmente esclarecidas. Alguns autores descrevem que são conjugados no fígado ou rim e excretados pela bile ou urina. A absorção de flavonóides glicosilados no intestino delgado tem sido pouco pesquisada. De fato, achava-se que a absorção não ocorresse nessa porção do intestino (LAMBERT et al., 1999). Algumas bactérias são capazes de romper as ligações heterocíclicas e degradar os flavonóides a ácidos fenólicos que podem ser absorvidos, conjugados e excretados, ou metabolizados quimicamente ou enzimaticamente (PETERSON e DWYER, 1998). O metabolismo desses compostos pode influenciar sua biodisponibilidade e absorção através do intestino delgado. Tem sido relatado que enzimas citosólicas, como β -glicosidase (EC 3.2.1.21), podem romper a ligação β -1,4-glicosídica de certos flavonóides glicosilados (LAMBERT et al., 1999). IOKU et al. (1998) afirmaram que glicosil-flavonóides são hidrolisados, liberando flavonóides agliconas no jejuno. A ingestão de isoflavonas glicosiladas, biologicamente inertes, são submetidas às hidrólises ácida e enzimática pelos ácidos gástricos e pelas glicosilases intestinais (HEINONEN, WÄHÄLÄ e ADLERCREUTZ, 1999). A Figura 5 sugere uma via metabólica para a daidzeína, flavonóide muito consumido na dieta oriental, segundo os estudos de HEINONEN, WÄHÄLÄ e ADLERCREUTZ (1999).

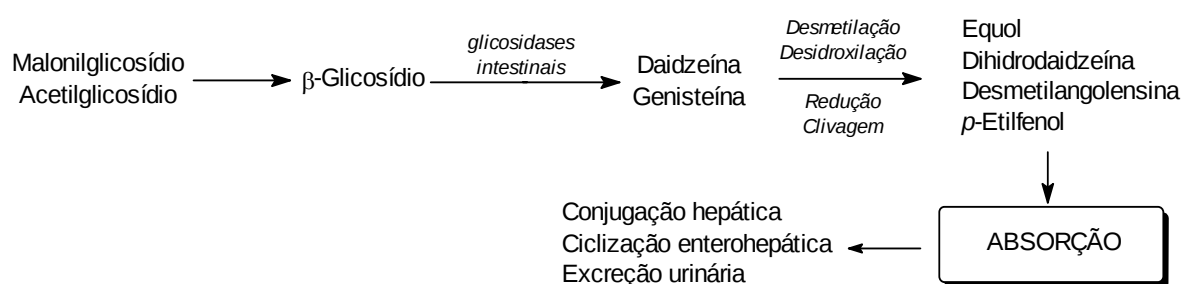
FIGURA 5 - VIA METABÓLICA PARA A DAIDZEÍNA



FONTE: HEINONEN, WÄHÄLÄ e ADLERCREUTZ, 1999.

Sugere-se que a completa degradação de flavonóides ocorre mediante clivagem do pirano (Figura 2, C) pela ação de enzimas, produzidas por microrganismos intestinais, gerando os ácidos fenilacético, fenilpropionico e outros subprodutos inertes (GUGLER, LESCHIK e DENGLER, 1975). Entretanto, outras reações foram verificadas por técnicas rápidas para analisar flavonóides e produtos de degradação em amostras de fezes e urina humana (PISKULA e TERAQ, 1998; MANACH et al., 1998). A Figura 6 mostra esquematicamente as transformações ocorridas no metabolismo de isoflavonas em humanos e outros animais.

FIGURA 6 - TRANSFORMAÇÕES OCORRIDAS COM ISOFLAVONAS EM HUMANOS E ANIMAIS DOMÉSTICOS



FONTE: SETCHELL e CASSIDY, 1999.

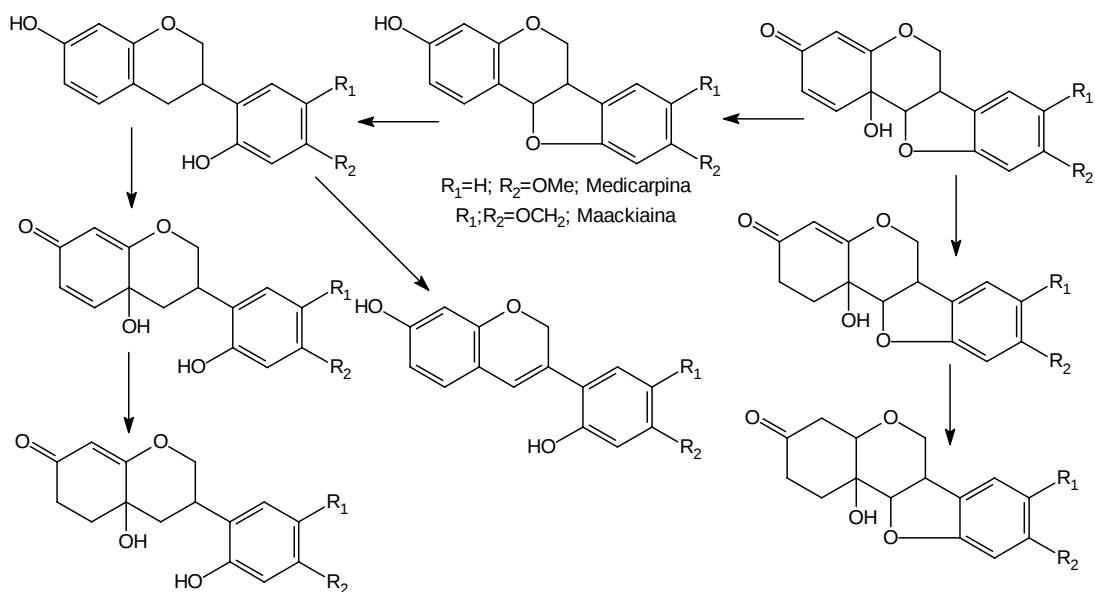
2.1 HIDROXILAÇÃO

Os grupos hidroxílicos do anel A nas posições 5 e 7 são formados durante a síntese do flavonóide, embora outras hidroxilas nas posições 6 e 8 possam ser encontradas (FORKMANN, 1991). A hidroxilação da posição 4' do anel B ocorre pela ação da chalcona sintase sobre 4-coumaril-CoA. Estudos

enzimáticos sobre plantas geneticamente modificadas têm revelado que a hidroxilação no anel B nas posições 3' e 5' é possível com enzimas específicas (HELLER e FORKMANN, 1988). Flavonóide 3'-hidrolase e flavonóide 3',5'-hidrolase promovem a hidroxilação de naringenina e dihidrokaempferol nas posições 3' e 3', 5', respectivamente. Outros flavonóides passíveis de hidroxilação na posição 3' são apigenina e kaempferol (STICK, EBERMANN e FORKMANN, 1988). Enquanto a origem dos grupos hidroxílicos nas posições 3', 4' e 5' do anel B é bem conhecida, o mecanismo que leva à hidroxilação na posição 2' de flavonas e flavonóis ainda não foi esclarecido (WOLLENWEBER et al., 1989). Outro exemplo de hidroxilação de flavonóides ocorre com pterocarpanas de forma paralela à biossíntese de 6a-hidroxipterocarpanas, mas com significativas diferenças em seus mecanismos. A Figura 7 mostra a seqüência metabólica por via microbiana de pterocarpanas, segundo HÖHL et al. citados por HARBONE (1993).

Algumas enzimas responsáveis por todos os passos metabólicos têm sido identificadas na formação de pterocarpanas, e também de isoflavonas. Segundo HELLER e FORKMANN (1988) tais enzimas são: isoflavona 3'-hidroxilase, isoflavona 2'-hidroxilase, isoflavona redutase, pterocarpana sintase, pterocarpana 6a-hidroxilase, pterocarpana 3-O-metiltransferase, pterocarpana 2-C-preniltransferase, 4-prenilpterocarpana ciclase I, 2-prenilpterocarpana ciclase I, 2-prenilpterocarpana ciclase II.

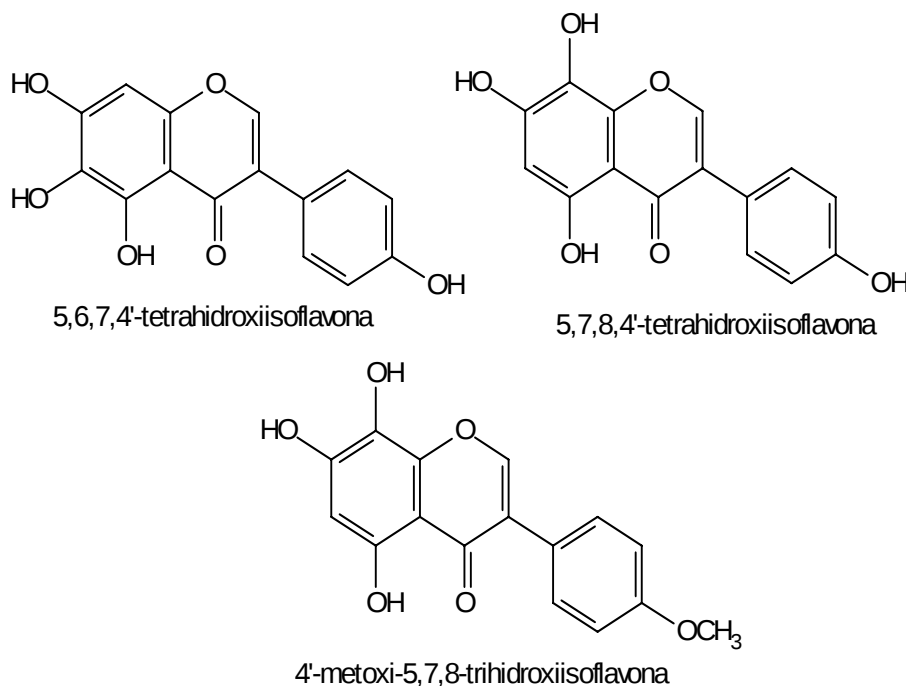
FIGURA 7 - METABOLISMO MICROBIANO DE PTEROCARPANAS



FONTE: HARBONE, 1993.

As reações de hidroxilação estão ligadas à biossíntese de isoflavonóides em plantas, podendo ser seguida pela migração do grupamento aril de flavanonas. Isto pode ser verificado na conversão de liquiritigenina (7,4'-dihidroxiisoflavona) a daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona), via desidratação da 2,7,4'-trihidroxiisoflavona, sendo também observado na conversão de naringenina a genisteína (STEELE et al., 1999). O interesse de pesquisadores sobre a hidroxilação de flavonóides reside no fato da presença de grupos hidroxílicos na estrutura do flavonóide aumentar sua atividade antioxidante, principalmente na posição 3. Grupos hidroxílicos adicionados às posições 3, 5 e 7 dos anéis A e C são menos importantes (PIETTA, 2000). Isoflavonóides polihidroxilados têm sido obtidos a partir de genisteína e biochanina A, utilizando bactérias dos gêneros *Micrococcus* e *Arthrobacter* isoladas de tempeh (KLUS e BARZ, 1998) (Figura 8).

FIGURA 8 - ESTRUTURAS PLANAS DE ISOFLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS OBTIDOS PELA TRANSFORMAÇÃO BACTERINA DE GENISTEÍNA E BIOCHANINA A



2.2 METILAÇÃO

A metilação, outra das transformações bioquímicas observadas em flavonóides, pode ser catalisada por enzimas como a O-metiltransferase que transfere o grupo metil da S-adenosilmetionina para grupos hidroxílicos de flavonóides (EBEL e GRISEBACH, 1988). No caso de flavonóis e flavonas, O-metiltransferases têm catalisado a metilação das posições hidroxiladas do anel A (posições 5, 6, 7, 8), do anel B (posições 2', 3', 4', 5') e da cadeia heterocíclica C na posição 3. Além disso, as enzimas demonstram alta especificidade pelo substrato. A metilação na posição 3 de flavonóides é promovida pela flavonol-3-O-metiltransferase e na posição 6 pela flavonol-6-O-metiltransferase. Já na posição 7 tem-se a flavonol-7-O-metiltransferase e na posição 4' a flavonol-4'-O-metiltransferase. Metiltransferases para a posição 3' de flavonóides têm sido isoladas de *Zea mays* (LARSON, 1989). Outras metiltransferases foram isoladas de *Cicer arietinum* e *Medicago sativa* (HARBORNE, 1993). De *Medicago sativa* também foi isolada metiltransferase específica para a posição 2' de chalconas 2',4'-dihidroxiladas, denominada chalcona 2'-O-metiltransferase (MAXWELL, EDWARDS e DIXON, 1992).

2.3 GLICOSILAÇÃO

A glicosilação, importante modificação de flavonóides, é capaz de aumentar a solubilidade dos mesmos e constitui reação fundamental para a acetilação.

Enzimas como as flavonóides-3-O-glicosiltransferases são responsáveis pela formação de alguns intermediários da biossíntese de antocianinas. Algumas dessas enzimas têm sido isoladas e purificadas de *Daucus carota*, *Picea abies*, *Hippeastrum sp.*, *Brassica oleraceae* e *Citrus paradisi* (HARBORNE, 1993). Algumas glicosiltransferases específicas para grupos hidroxílicos são a flavonóide-7-O-glicosiltransferase, flavonóide-3'-O-glicosiltransferase, flavonóide-4'-O-glicosiltransferase e flavonóide-5'-O-glicosiltransferase. Glicosiltransferases específicas para as posições 2' e 5' de flavonóis, parcialmente metilados foram descritos em *Chrysosplenium americanum* (HELLER e FORKMANN,

1988). Outras transformações envolvendo a glicosilação de flavonóides estão relacionadas com a ação de glicuronosiltransferases, isoflavona-4'-O-glicosiltransferase e C-glicosilação de 2-hidroxi flavanonas nas posições 6 e 8.

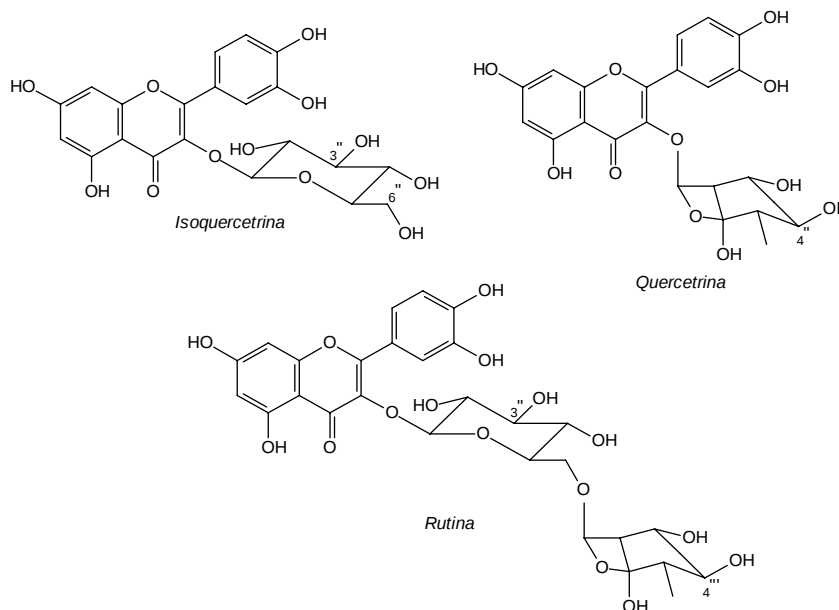
2.4 ACETILAÇÃO

A acetilação ocorre geralmente no final da biossíntese de flavonóides. Essa transformação (da mesma forma que a glicosilação) é importante para aumentar a solubilidade de vários metabólitos, bem como impedir a degradação de glicosil-flavonóides por glicosidases e estabilizar a estrutura de antocianinas (RENAUDIN e GUERN, 1990).

Metabólitos acetilados são amplamente encontrados na natureza, havendo basicamente dois tipos de substituição acetílica. A primeira ocorre com ácidos mono e dicarboxílicos com estruturas alifáticas ou aromáticas, os quais são acoplados à hidroxilas de um grupamento glicosil do flavonóide. O segundo tipo envolve a ligação do ácido sulfúrico ao grupo fenólico de uma flavona ou flavonol (BARRON et al., 1988).

DANIELI et al. (1989) evidenciaram a capacidade de uma protease de acetilar isoquercetrina-D-glicopiranosídeo ao seu correspondente 6"-O-mono, 3"-O-mono e 3",6"-O-dibutanoil conjugados, enquanto que quercetrina-D-ramnopiranosídeo não foi afetada. Posteriormente, DANIELI et al. (1997) demonstraram que uma lipase de *Candida antarctica* catalisou a acetilação de isoquercetrina a 3",6"-O-diacetato isoquercetrina, de quercetrina a 4"-O-acetato quercetrina e de rutina a 3",4"-O-diacetato rutina (Figura 9).

FIGURA 9 - ESTRUTURAS DE ISOQUERCETRINA, QUERCETRINA E RUTINA



2.5 HIDRÓLISE

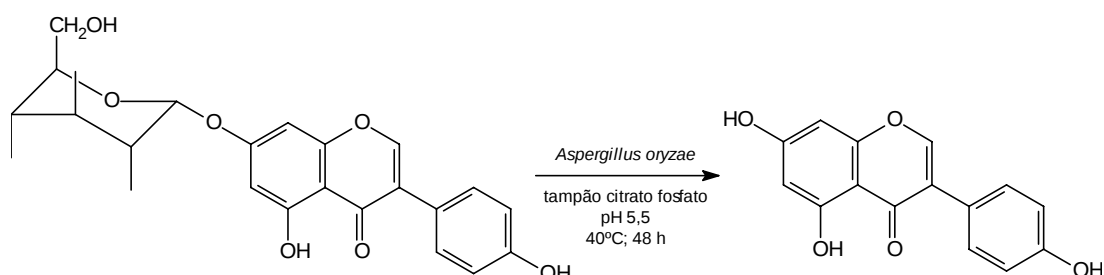
Acil e glicosil hidrolases estão envolvidas na biossíntese de flavonóides. Muitas glicosidases vegetais e microbianas podem catalisar a hidrólise de glicosil-flavonóide, cuja transformação tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores (ESAKI et al., 1999; CARRÃO-PANIZZI e BORDINGNON, 2000; PARK et al., 2001a; PARK et al., 2001b), principalmente a hidrólise de glicosil-isoflavonóides de soja. No Brasil, segundo maior produtor de soja (*Glycine max*), a transformação de isoflavonóides

torna-se ainda mais interessante. A soja contém grandes quantidades desses flavonóides glicosilados (PARK et al., 2001c) passíveis de hidrólise enzimática. As formas agliconas produzidas são mais ativas contra radicais livres e tumores da mama e próstata, entre outras atividades biológicas (SETCHELL e CASSIDY, 1999).

Em grãos de soja podem ser encontradas isoflavonas, predominantemente nas formas glicosilada, malonilglicosilada e acetilglicosilada. No entanto, durante processos térmicos e fermentativos, esses compostos fenólicos glicosilados são transformados às suas formas agliconas e acumulados no produto fermentado final (KLUS e BARZ, 1998). A Figura 10 mostra a transformação enzimática de uma glicosil-isoflavona (genistina) amplamente encontrada em grãos de soja à genisteína, sua forma aglicona (AGUIAR, 2004; PARK et al., 2001abc).

AGUIAR (2004) e PARK et al. (2001ab) reportaram que β -glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* foi capaz de hidrolisar as isoflavonas glicosiladas a agliconas, quando essa enzima foi aplicada sobre farinha desengordurada de soja durante fermentação semi-sólida. A associação da atividade de β -glicosidase com a hidrólise de glicosil-isoflavonóides, apresentada por PARK et al. (2001ab) foi confirmada por outros pesquisadores. IBE et al. (2001) perceberam que a bactéria isolada de palhas de arroz, identificada com IF9916, foi capaz de converter grande quantidade de glicosil-isoflavonas às suas correspondentes formas agliconas e produziu alta atividade de β -glicosidase. Da mesma forma, MATSUDA et al. (1992) já haviam reportado que β -glicosidase de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425 mostrou grande capacidade hidrolítica de glicosil-isoflavonas em xarope cozido de soja. Tem-se notado que produtos não-fermentados de soja contém menor teor de isoflavonas agliconas que os fermentados. Em produtos fermentados, como *miso* e *tempeh*, a conversão de 7-D-glicosil-isoflavonas está associada à β -glicosidase bacteriana. No produto fermentado, denominado *natto*, os teores de isoflavonóides agliconas foram similares aos de glicosilados, podendo-se presumir que *Bacillus natto* (bactéria responsável pela fermentação) não produziu β -glicosidase. Outro fato observado envolve o alto teor de glicosil isoflavonóides em leite fermentado de soja em relação as agliconas. A causa seria a ineficiente fermentação do leite de soja pelas bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), ou a não-produção de β -glicosidase por essas bactérias. De acordo com CARRÃO-PANIZZI e BORDINGNON (2000), β -glicosidase endógena de soja foi também capaz de hidrolisar glicosil-isoflavonas a agliconas.

FIGURA 10 - TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSIL A ISOFLAVONAS AGLICONAS



FONTE: AGUIAR, 2004; PARK et al., 2001abc.

A conversão de glicosil-isoflavonóides a suas agliconas tem sido efetuada principalmente com β -glicosidase, embora possa ocorrer com outras enzimas. MATSUURA e OBATA (1993), por exemplo,

purificaram três isoenzimas de β -glicosidase de soja com capacidade de hidrolisar glicosil-isoflavonas presentes em leite de soja. Em outro estudo, MATSUURA, SASAKI e MURAO (1995) observaram que a β -glicosidase foi capaz de hidrolisar daidzina e genistina, produzindo daidzeína e genisteína. Outra enzima, denominada lactase-florizina-hidrolase (LPH; EC 3.2.1.62), encontrada no intestino de mamíferos foi capaz de hidrolisar alguns tipos de isoflavonas e flavonóis glicosilados à formas agliconas (DAY et al., 2000). A hidrólise de flavonóides como rutina, forma glicosilada da quercetina (6-O- α -L-raminopiranosil- β -D-glicopiranosídeo) foi avaliada por NARIKAWA, SHINOYAMA e FUJII (2000). Anteriormente, NARIKAWA et al. (1998) reportaram que algumas glicosidases foram produzidas em cultura líquida contendo rutina como indutor. *Penicillium rugulosum* IFO 7242 produziu β -rutinosidase capaz de hidrolisar rutina em rutinose e quercetina. É importante notar que essa glicosidase não apresentava atividade sobre 4-nitrofenil β -glicosídeo ou celobiose, os quais são usados geralmente em ensaios enzimáticos de β -glicosidase.

3 REAÇÕES DE ISOFLAVONÓIDES

A Tabela 1 apresenta algumas das enzimas relacionadas com as transformações de flavonóides por preparações enzimáticas e os produtos obtidos.

TABELA 1 - TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DE ISOFLAVONÓIDES

Substrato	Enzima	Produto
Biochanina A	Oxidoredutase/NADPH	(3S)-dihidrobiochanina A
Kievitona	Kievitona hidratase	Kievitona hidratada
Medicarpina	Oxidoredutase/NADPH	Vestitol
Maakiaina	Oxidoredutase/NADPH	7,2'-dihidroxi-4',5'-metileno-dioxiisoflavona
Pisatina	Monooxigenase	6a-hidroximaakiaina

FONTE: DEWICK, 1993.

Muitos microrganismos apresentam a capacidade para metabolizar isoflavonóides de planta e modificar suas estruturas. A análise da estrutura de isoflavonóides modificados por microrganismos sugere que alguns dos compostos podem ser produzidos na natureza pelo metabolismo microbiano. Microrganismos simbióticos do rizoma vegetal têm sido utilizados por pesquisadores para verificar a produção de fitoalexinas em vegetais. No entanto, essas transformações podem levar à formação de compostos intermediários na seqüência metabólica passíveis de serem modificados posteriormente a outros fragmentos. Alguns exemplos dessas transformações são a desmetilação da 6a-hidroxipterocarpana pisatina por *Nectria haematococca* (VAN-ETTEN, MATTHEWS e MATTHEWS, 1989), a desmetilação de medicarpina por *Ascochyta rabiei* (KRAFT et al., 1987), e a desmetilação de biocanina a genisteína por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, com redução de duas isoflavonas (TURBEK et al., 1990).

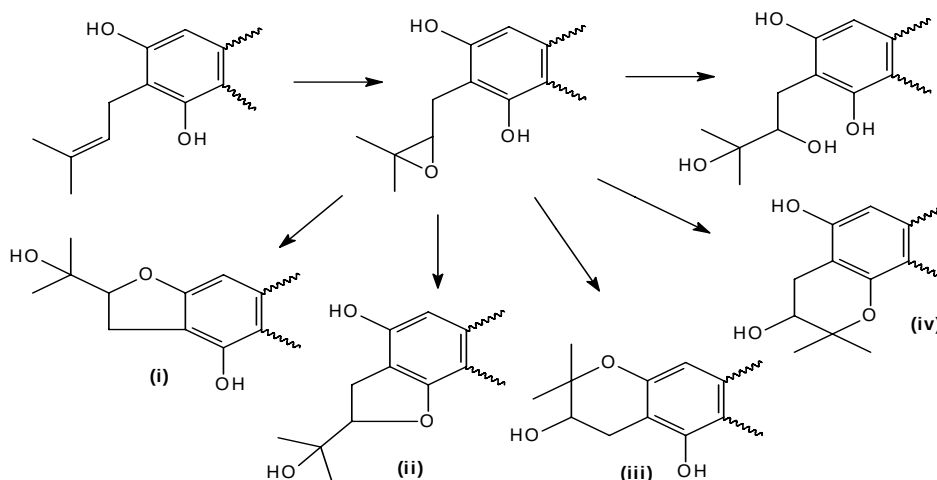
A redução de isoflavonóides a isoflavanonas é comum no catabolismo inicial de muitos fungos do gênero *Fusarium* (SCHLIEPER e BARZ, 1987), tal como a conversão de biochanina A em (3S)-dihidrobiochanina A (SCHLIEPER, TIEMANN e BARZ, 1990). Redução análoga é a conversão da 2'-hidroxiformononetina em (3R)-vestitona por meio do sistema enzimático de *Cicer arietinum*. A degradação redutiva de pterocarpanas a 2'-hidroxiisoflavanonas ocorre paralelamente à hidrogenação. Muitas das modificações microbianas de isoflavonas resultam de processos oxidativos, gerando compostos

hidroxilados ou seus derivados. A hidroxilação de maackiaina por *Nectria haematococca* envolve a incorporação de oxigênio molecular, enquanto a biossíntese de pisatina em *Pisum sativum* incorpora oxigênio originado de uma molécula de água (MATTHEWS et al., 1987). Ao contrário, em *Glycine max* a hidroxila de glicinol é biossinteticamente derivada de oxigênio molecular (MATTHEWS, PLATTNER e VAN-ETTEN, 1989).

É interessante notar que nas estruturas de isoflavonóides contendo grupos isoprenil alifáticos ou cíclicos, a modificação microbiana ocorre preferencialmente nesses substituintes. A análise estrutural de vários metabólitos obtidos de 2,3-dehidrokievitona ou 7-O-metilluteona (TAHARA et al., 1987), ou edunol (TAHARA e INGHAM, 1987) sugere que a modificação inicial pode ser a epoxidação da ligação dupla da unidade dimetilalil. Têm se notado ataque nucleofílico da água formando glicol ou, ainda, ataque do grupamento fenólico formando as estruturas cíclicas (i), (ii), (iii) ou (iv), como indicado na Figura 11.

A hidratação da ligação dupla dimetilalil constitui uma alternativa da seqüência de epoxidação de isoflavonóides (NAKAHARA et al., 1986). A hidratação de kievitona a kievitona-hidratada foi provavelmente o primeiro exemplo notado, que culminou com a purificação da enzima kievitona-hidratase de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (TURBEK et al., 1990). No entanto, alguns flavonóides são potenciais inibidores enzimáticos. Podem inibir enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido (espécie química ligada a processos oxidativos nas células), tais como xantina-oxidase (HANASAKI, OGAWA e FUKUI, 1994), proteína quinase C (URSINI et al., 1994), ciclooxigenase, lipoxigenase, monooxigenase microsomal, glutatona transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase (KORKINA e AFANASEV, 1997; BROWN et al., 1998).

FIGURA 11 - TRANSFORMAÇÃO MICROBIANA DE DIMETILALIL-ISOFLAVONÓIDES



4 CONCLUSÃO

Com as novas tendências de aplicação dos flavonóides na prevenção de diferentes enfermidades, como tumores e doenças ligadas aos processos oxidativos na célula, torna-se cada vez mais freqüente o estudo desses compostos e suas transformações enzimáticas. Essas transformações podem formar muitas vezes flavonóides com maior atividade biológica, como a ação de beta-glicosilases sobre glicosil-isoflavonas gerando formas agliconas com maior atividade biológica contra a peroxidação lipídica ou contra tumores da próstata e da mama.

ABSTRACT

ENZYME TRANSFORMATION OF FLAVONOIDS

A literature review about microbial and enzyme transformation of flavonoids was accomplished. Enzyme reactions, as well as, the action of microbial cells on flavonoids were discussed in seven distinct topics. The effects of these transformations were discussed for some reactions. The scientific literature has described that many microorganisms and enzymes possess the ability to metabolize plant flavonoids. Modified structures of flavonoids have been identified after microbial cultures or specific enzymatic reactions. Such alterations in their chemical structures, may produce flavonoids with higher biological activities (antioxidant, anti-inflammatory, antitumoral and antimicrobial).

KEY-WORDS: FLAVONOIDS; ENZYME CONVERSION; MICROBIAL TRANSFORMATION.

REFERÊNCIAS

- 1 AGUIAR, C. L. **Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja** (*Glycine max* L.). Campinas, 2004. 286 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 2 ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 43, p. 356-360, 1998.
- 3 BARRON, D.; VARIN, L.; IBRAHIM, R. K.; HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Sulphated flavonoids: an update. **Phytochemistry**, Pullman, v. 27, p. 2375-2395, 1988.
- 4 BROWN, J. E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C.A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochemical Journal**, La Jolla, v. 330, n. 3, p. 1173-1178, 1998.
- 5 CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDINGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 873-876, 2000.
- 6 DANIELI, B.; DE BELLIS, P.; CARREA, G.; RIVA, S. Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides. **Heterocycles**, Heidelberg, v. 29, p. 2061-2064, 1989.
- 7 DANIELI, B.; LUISETTI, M.; SAMPOGNARO, G.; CARREA, G.; RIVA, S. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Gainesville, v. 3, p. 193-201, 1997.
- 8 DAY, A.J.; CANADA, F.J.; DIAZ, J.C.; KROON, P.A.; MCLAUCHLAN, R.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MORGAN, M.R.A.; WILLIAMSON, G. Dietary flavonoid and isoflavone glucoside are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 468, n. 2-3, p. 166-170, 2000.
- 9 DEWICK, P.M. **The Flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 117.
- 10 DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, Tucson, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.
- 11 EBEL, J.; GRISEBACH, H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: a molecular analysis. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 13, n. 1, p. 23-27, 1988.
- 12 ESAKI, H.; WATANABE, R.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative O-dihydroxyisoflavones in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 5, p. 851-858, 1999.
- 13 FORKMANN, G. Flavonoids as flower pigment: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. **Plant Breeding**, Kiel, v. 106, p. 1-26, 1991.
- 14 GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H.J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Heidelberg, v. 9, n. 2-3, p. 229-234, 1975.

- 15 HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, Los Angeles, v. 16, p. 845–850, 1994.
- 16 HARBORNE, J.B. **The Flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1993. p. 543.
- 17 HEINONEN, S.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-euol in human urine by CG-MS using authentic reference compounds. **Analytical Chemistry**, Columbus, v. 71, n. 12, p. 211-219, 1999.
- 18 HELLER, W.; FORKMANN, G. **The Flavonoids**: advances in research since 1980. London: Chapman and Hall, 1988. p. 399.
- 19 HERRMANN, A.P.; WILLEMS, M.; JANKE, H.D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, Lyngby, v. 35, n. 11, p. 2575-2582, 2001.
- 20 IBE, S.; KUMADA, K.; YOSHIBA, M.; ONGA, T. Production of natto which contains a high level of isoflavone aglycones. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 27-34, 2001.
- 21 IOKU, K.; PONGPIRIYADACHA, Y.; KONISHI, Y.; TAKEI, Y.; NAKATANI, N.; TERAOKA, J. Beta-glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, n. 7, p. 1428-1431, 1998.
- 22 IBRAHIM, A.R.S. Sulfation of naringenin by *Cunninghamella elegans*. **Phytochemistry**, Pullman, v. 53, n. 9, p. 209-212, 2000.
- 23 JEON, K.S.; JI, G.E.; KWANG, I.K. Assay of beta-glucosidase activity of bifidobacteria and the hydrolysis of isoflavone glycosides by *Bifidobacterium sp.* Int-57 in soymilk fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 12, n. 1, p. 8-13, 2002.
- 24 KINOSHITA, E.; MURAKAMI, S.; AISHIMA, T. Enzymatic formation of ether linkage producing shoyuflavones from genistein and (±)-trans-epoxysuccinic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 48, n. 3, p. 2149-2154, 2000.
- 25 KLUS, K.; BARZ, W. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from Tempe. **Phytochemistry**, Pullman, v. 47, n. 6, p. 1045-1048, 1998.
- 26 KLUS, K.; BÖRGER-PAPENDORF, G.; BARZ, W. Formation of 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (factor 2) from soybean seed isoflavones by bacteria isolated from tempe. **Phytochemistry**, Pullman, v. 34, n. 4, p. 979-981, 1993.
- 27 KORKINA, L.G.; AFANASEV, I.B. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 151.
- 28 KRAFT, B.; SCHWENEN, L.; STOCKL, D.; BARZ, W. Degradation of the pterocarpan phytoalexin medicarpin by *Ascochyta rabiei*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 147, p. 201-206, 1987.
- 29 LAMBERT, N.; KROON, P.A.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MCLAUCHLAN, R.W.; DAY, A. J.; WILLIAMSON, G. Purification of cytosolic beta-glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glucosides. **Biochimica et Biophysica Acta**, San Diego, v. 1435, p. 110-116, 1999.
- 30 LARSON, R. L. Flavonoid 3'-O-methylation by a *Zea mays* L. preparation. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Bielefeld, v. 184, p. 453-460, 1989.
- 31 MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; DEMINGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 426, n. 3, p. 331-336, 1998.
- 32 MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of a novel isoflavone glucoside-hydrolyzing beta-glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tokyo, v. 77, n. 4, p. 439-441, 1992.
- 33 MATSUURA, M.; OBATA, A. Beta-glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of**

Food Science, Chicago, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

- 34 MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on beta-glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 9, p. 1623-1627, 1995.
- 35 MATTHEWS, D.E.; PLATTNER, R.D.; VANETTEN, H.D. The 6a oxygen of the pterocarpan glycinol is derived from molecular oxygen. **Phytochemistry**, Pullman, v. 28, p. 113-115, 1989.
- 36 MATTHEWS, D.E.; WEINER, E.J.; MATTHEWS, P.S.; VAN-ETTEN, H.D. Role of oxygenases in pisatin biosynthesis and in the fungal degradation of maackiain. **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, p. 365-370, 1987.
- 37 MAXWELL, C.A, EDWARDS, R; DIXON, R.A. Identification, purification, and characterization of S-adenosyl-L-methionine: isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Heidelberg, v. 293, p. 158-166, 1992.
- 38 NAKAHARA, S.; TAHARA, S.; MIZUTANI, J.; INGHAM, J.L. Transformation of the diprenylated isoflavone 2'-hydroxylupalbigenin by *Aspergillus flavus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 50, p. 863-873, 1986.
- 39 NARIKAWA, T.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. A beta-rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n. 6, p. 1317-1319, 2000.
- 40 NARIKAWA, T.; KARAKI, Y.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. Rutin degradation by culture filtrates from penicillia. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, Tokyo, v. 72, p. 473-479, 1998.
- 41 PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; SATO, H.H. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal beta-glucosidase. **Food Science and Industry**, Seoul, v. 34, n. 4, p. 14-19, 2001a.
- 42 PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotechnology, Ciência, Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, p. 12-14, 2001b.
- 43 PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. Survey of isoflavone contents in Brazilian soybean. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, Vigo, n. 3, n. 3, p. 156-160, 2001c.
- 44 PARK, Y.K.; LEE, C.Y. Identification of isorhamnetin-4'-glucoside in onions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 44, p. 34-36, 1996.
- 45 PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, West Lafayette, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.
- 46 PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- 47 PISKULA, M.K.; TERAOKA, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, n. 7, p. 1172-1178, 1998.
- 48 RENAUDIN, J.P.; GUERN, J. **Secondary products from plant tissue culture**. London: Clarendon Press, 1990. p. 59.
- 49 SCHLIEPER, D.; TIEMANN, K.; BARZ, W. Stereospecificity of hydrogen transfer by fungal and plant NADPH:isoflavone oxidoreductases. **Phytochemistry**, Pullman, v. 29, n. 5, p.1519-1524, 1990.
- 50 SCHLIEPER, D.; BARZ, W. NADPH:biochanin A oxidoreductase from the fungus *Fusarium javanicum*. **Phytochemistry**, Pullman, v. 26, p. 2495-2498, 1987.
- 51 SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 129, p. 758-767, 1999.
- 52 STEELE, C.L.; GIJZEN, M.; QUTOB, D.; DIXON, R.A. Molecular characterization of the enzyme catalyzing

the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Heidelberg, v. 367, n. 1, p. 146-150, 1999.

- 53 STICK, K.; EBERMANN, R.; FORKMANN, G. Einfluß cytochrom P-450-spezifischer inhibitoren auf die aktivität von flavonoid 3'-hydroxylase und flavon synthase II bei verschiedenen Pflanzen. **Phyton**, Horn, v. 28, p. 237-247, 1988.
- 54 TANAKA, M.; MIZUTANI, J.; TAHARA, S. Cyclization of a prenylated isoflavone via enzymatic epoxidation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 1, p. 171-172, 1996.
- 55 TAHARA, S.; INGHAM, J.L. Metabolism of the prenylated pterocarpan edunol by *Aspergillus flavus*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 42, p. 1050-1054, 1987.
- 56 TAHARA, S.; MISUMI, E.; MIZUTANI, J.; INGHAM, J.L. Fungal metabolism of the prenylated isoflavone 2,3-dehydrokievitone. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 42, p. 1055-1062, 1987.
- 57 TURBEK, C.S.; LI, D.; CHOI, G.H.; SCHARDL, C.L.; SMITH, D.A. Induction and purification of kievitone hydratase from *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Phytochemistry**, Pullman, v. 29, p. 2841-2846, 1990.
- 58 URSINI, F.; MAIORINO, M.; MORAZZONI, P.; ROVERI, A.; PIFFERI, G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radical Biology and Medicine**, Los Angeles, v. 16, n. 5, p. 547-553, 1994.
- 59 VAN-ETTEN, H.D.; MATTHEWS, D.E.; MATTHEWS, P.S. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 143-164, 1989.
- 60 WOLLENWEBER, E.; MANN, K.; INUMA, M.; TANAKA, T.; MIZUNO, M. 8,22 -Dihydroxyflavone from *Primula pulverulenta*. **Phytochemistry**, Pullman, v. 27, n. 5, p. 1483-1486, 1989.