

Janaina Fernanda Packer

**MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSÍDEOS DE
STEVIA REBAUDIANA POR *Gibberella fujikuroi***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Brás Heleno de Oliveira
Co-orientador: Prof. Márcio Chimelli

**CURITIBA
2006**

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu namorado pela paciência que tiveram, pelo apoio em todas as horas e pelo amor, talvez o mais importante a ser ressaltado!

Agradecimentos

São muitas as pessoas a quem tenho que agradecer e peço desculpas antecipadamente se de alguém eu me esquecer...

Primeiramente quero agradecer a Deus que me deu a vida, me dá força e paz para recomeçar a cada dia minha missão.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, que mais que orientador, foi amigo, me compreendeu, me auxiliou sempre que precisei, me deu espaço para errar e aprender com meus erros. Professor, obrigada! Foi um prazer ter trabalhado com o senhor!

Ao Prof. Dr. Márcio Chimelli pelas conversas sempre muito construtivas e pelo auxílio fundamental principalmente no início do trabalho. Obrigado por ter sido meu guia neste “ponta pé” inicial.

Aos meus colegas de laboratório, sempre prestativos, Elisa, Daniel, Alexandre, Maurício, Júlio, César e Patrícia. Obrigada pela ajuda e pelo estímulo. Contem sempre comigo...

Aos colegas de Pós graduação, em especial à Andrezza, à Miryan e à Camila, que me fizeram ver que estávamos todas no mesmo barco e unidas por um objetivo em comum: a formação de um ideal, de um crescimento científico e pessoal melhor e estruturado.

Ao programa de Pós-graduação por ter acreditado em mim, por ter me dado suporte sempre que precisei. Aqui faço um agradecimento especial à Regina, à Prof. Dra. Almeriane e ao Prof. Dr. Cid Aimbiré.

À empresa Steviafarma S/A que me deu suporte para realização deste trabalho.

Agradecimentos também tenho que dar à minha família: Amos e Isolde Packer (meus pais), Jackson e Aline Packer (meu irmão e cunhada) e a meu namorado Everson que sempre me motivaram nesta conquista, Obrigada!

Ah...sim, queria agradecer à “Gib” (*Gibberella fujikuroi*), o que seria do nosso trabalho sem você!

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC: American type culture collection
- δ : deslocamento químico
- CC: cromatografia em coluna
- CCD: cromatografia em camada delgada
- CCDC: cromatografia em camada delgada centrífuga
- CGTase: ciclodextrina glucanotransferase
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas.
- DMAPP: dimetilalil difosfato
- DXP: 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfatase
- DXS: 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfatase sintase
- EFS: Extração em Fase Sólida
- EM: espectrometria de massas
- FDA: Food and Drug Administration
- FPP: farnesil difosfato
- GA₃: Ácido giberélico
- GAP: gliceraldeído-3-fosfato
- G. fujikuroi*: *Gibberella fujikuroi*
- Glc: glicose
- GGPP: geranyl geranyl difosfato
- Hz: hertz
- HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
- IAL: Instituto Adolfo Lutz
- ICI: Meio de cultura de escolha para processos de fermentação para *Gibberella fujikuroi*
- IPP: isopentenil difosfato
- IV: Infravermelho
- MEP: metileritritol fosfato

MRM: Múltipla Reação Monitorada

MS1: Análise dos compostos pelos seus íons moleculares

MS2: Análise dos compostos pelos seus fragmentos

MVA: mevalonato

ppm : parte por milhão

Rf : razão de frente

Rha: Ramnose

RMN ^{13}C : ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Sol. Elementos traço: Solução de elementos traço

Sumário

<u>AGRADECIMENTOS.....</u>	<u>II</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</u>	<u>III</u>
<u>SUMÁRIO</u>	<u>V</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<u>IX</u>
<u>LISTA DE GRÁFICOS</u>	<u>X</u>
<u>RESUMO</u>	<u>XI</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>XII</u>
<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
1.1 A PLANTA <i>STEVIA REBAUDIANA</i> (BERT.) BERTONI	1
1.1.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DA PLANTA	4
1.1.2 FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA	7
1.2 ESTEVIOSÍDEO	9
1.2.1 MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ESTEVIOSÍDEO	11
1.3 <i>GIBBERELLA FUJIKUROI</i>	12
1.4 OBJETIVOS.....	13
1.4.1 OBJETIVO GERAL	13
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
<u>2 METODOLOGIA</u>	<u>15</u>
2.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	15
2.2 CROMATOGRAFIA.....	15
2.2.1 ANÁLISE POR CLAE	16
2.2.2 ANÁLISE POR CLAE-EM-EM.....	16
2.3 OBTENÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A	17
2.3.1 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA	17
2.3.2 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA CIRCULAR CENTRÍFUGA (CHROMATOTRON®).....	17

	vi
2.4	OBTENÇÃO DO ESTEVIOLBIOSÍDEO E REBAUDIOSÍDEO B 18
2.5	OBTENÇÃO DO ESTEVIOL 19
2.6	OBTENÇÃO DO ISOESTEVIOL 19
2.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA 20
2.8	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE <i>GIBBERELLA</i>
	<i>FUJIKUROI</i> 21
2.8.1	ISOLAMENTO 21
2.8.2	CONSERVAÇÃO DA CEPA 21
2.8.3	ATIVAÇÃO DA CEPA E VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS 22
2.8.4	VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GIBERELINAS 22
2.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
	COMPONENTES DO ESTEVIOSÍDEO COMERCIAL 23
2.10	OBTENÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO 24
2.11	MODIFICAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO 25
2.12	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
	25
2.13	ANÁLISE DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A POR MRM 26
2.14	CARACTERIZAÇÃO DO ESTEVIOLMONOSÍDEO 26
3	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO 27</u>
3.1	OBTENÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A 27
3.2	OBTENÇÃO DO ESTEVIOLBIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO B 30
3.3	OBTENÇÃO DO ESTEVIOL 33
3.4	OBTENÇÃO DO ISOESTEVIOL 34
3.5	ATIVIDADE HEMOLÍTICA 35
3.6	CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE <i>GIBBERELLA FUJIKUROI</i> 35
3.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 39
3.8	MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ESTEVIOSÍDEO 41
3.9	MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO PRODUTO COMERCIAL 44
3.10	CARACTERIZAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A
	POR MRM 53
3.11	CARACTERIZAÇÃO DO ESTEVIOLMONOSÍDEO 53
4	<u>CONCLUSÕES 54</u>
5	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55</u>
6	<u>ANEXOS 61</u>

Lista de Figuras

Figura 1 - A Folha de <i>Stevia rebaudiana</i>	2
Figura 2 - Localização dos maiores cultivos na América	3
Figura 3 - Rota de biossíntese de diterpenos	5
Figura 4 - Esteviol e seus derivados	6
Figura 5 - <i>Gibberella fujikuroi</i>	12
Figura 6 - Estrutura do isoesteviol.....	20
Figura 7 - Cromatograma por CLAE do esteviosídeo	29
Figura 8 - Cromatograma por CLAE do rebaudiosídeo A	29
Figura 9 - Cromatoplasmas de separação de esteviolbiosídeo (I).....	30
Figura 10 - Cromatoplasmas de separação de esteviolbiosídeo (II)	31
Figura 11 - Cromatoplasmas de separação de esteviolbiosídeo (III)	31
Figura 12 - Cromatograma por CLAE do esteviolbiosídeo	32
Figura 13 - Cromatograma por CLAE do rebaudiosídeo B.....	32
Figura 14 - Cromatograma por CLAE do Esteviol	34
Figura 15 - Cromatograma por CLAE do isoesteviol.....	35
Figura 16 - Cultura de <i>G. fujikuroi</i> em Meio Ágar Sabouraud modificado (face superior), repique por isolamento	36
Figura 17 - Cultura de <i>G. fujikuroi</i> em Meio Ágar Sabouraud modificado (face inferior), repique por isolamento	37
Figura 18 - Cultura de <i>G. fujikuroi</i> em Meio YPG 2 % (face superior), repique por isolamento.....	37
Figura 19 - Cultura de <i>G. fujikuroi</i> em Meio YPG 2 % (face inferior), repique por isolamento.....	37
Figura 20 - Fotomicrografia do fungo filamentoso <i>G. fujikuroi</i>	38
Figura 21 - Fotomicrografia do fungo filamentoso <i>G. fujikuroi</i>	38
Figura 22 - Atividade antimicrobiana do esteviol frente à <i>Candida albicans</i>	40
Figura 23 - Atividade antimicrobiana do esteviol frente à <i>Gibberella fujikuroi</i>	41
Figura 24 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com esteviosídeo purificado: 5 dias	42
Figura 25 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com esteviosídeo purificado: 7 dias	43
Figura 26 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com esteviosídeo purificado: 15 dias	43
Figura 27 - Cromatograma por CLAE do produto Stevita Cristal® (ES)	45
Figura 28 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (ES): 5 dias	46
Figura 29 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (ES): 7 dias	46
Figura 30 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (ES): 15 dias	47
Figura 31 - Cromatograma por CLAE do produto Stevita Cristal® (RA).....	48
Figura 32 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (RA): 5 dias.....	49

Figura 33 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal [®] (RA): 7 dias.....	49
Figura 34 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal [®] (RA): 15 dias.....	50
Figura 35 - Possível rota de interconversões dos glicosídeos do esteviol.....	52
Figura 36 - Espectro de massas do esteviosídeo (MS1).....	61
Figura 37 - Espectro de massas do esteviosídeo (MS2).....	62
Figura 38 - Espectro no IV do esteviosídeo.....	63
Figura 39 - Espectro de RMN ¹ H do esteviosídeo.....	64
Figura 40 - Espectro de RMN ¹³ C do esteviosídeo.....	65
Figura 41 - Espectro de massas do rebaudiosídeo A (MS1).....	66
Figura 42 - Espectro de massas do rebaudiosídeo A (MS2).....	67
Figura 43 - Espectro de massas do esteviolbiosídeo (MS1).....	68
Figura 44 - Espectro de massas do esteviolbiosídeo (MS2).....	69
Figura 45 - Espectro no IV do esteviolbiosídeo.....	70
Figura 46 - Espectro de RMN ¹ H do esteviolbiosídeo.....	71
Figura 47 - Espectro de RMN ¹³ C do esteviolbiosídeo.....	72
Figura 48 - Espectro de massas do rebaudiosídeo B (MS1).....	73
Figura 49 - Espectro de massas do rebaudiosídeo B (MS2).....	74
Figura 50 - Espectro de massas do esteviol (MS1).....	75
Figura 51 - Espectro de massas do esteviol (MS2).....	76
Figura 52 - Espectro no IV do esteviol.....	77
Figura 53 - Espectro de RMN ¹ H do esteviol.....	78
Figura 54 - Espectro de RMN ¹³ C do esteviol.....	79
Figura 55 - Espectro de massas do isoesteviol (MS1).....	80
Figura 56 - Espectro no IV do isoesteviol.....	81
Figura 57 - Espectro de RMN ¹ H do isoesteviol.....	82
Figura 58 - Espectro de RMN ¹³ C do isoesteviol.....	83
Figura 59 - Espectro de massas do produto obtido da modificação enzimática da Stevita Cristal [®] (ES).....	84
Figura 60 - Espectro do esteviosídeo e rebaudiosídeo A purificados (MRM).....	85
Figura 61 - Espectro do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A biotransformados (MRM).....	86
Figura 62 - Espectro de massas do produto obtido da modificação enzimática da Stevita Cristal [®] (RA): modo positivo.....	87
Figura 63 - Espectro de massas do produto obtido da modificação enzimática da Stevita Cristal [®] (RA): modo negativo.....	88
Figura 64 - Espectro de massas do esteviolmonosídeo (MS2).....	89

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação entre três plantas produtoras de princípios adoçantes	7
Tabela 2 - Qualidade adoçante de alguns dos glicosídeos do esteviol	10
Tabela 3 - Espécies de <i>Fusarium</i> sp e sua capacidade para síntese de giberelinas	13
Tabela 4 - Condições para análise de GA ₃ por CLAE	23
Tabela 5 - Condições utilizadas para análise por CLAE do metabólito produzido	25
Tabela 6 - Condições para análise dos compostos isolados em CLAE	28
Tabela 7 - Qualificação da atividade antimicrobiana	40
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana: esteviol	40
Tabela 9 - Atividade antimicrobiana: rebaudiosídeo A	41

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Cinética da modificação enzimática do esteviosídeo puro.....	44
Gráfico 2 - Cinética da modificação enzimática da Stevita Cristal [®] (ES).....	47
Gráfico 3 - Cinética da modificação enzimática da Stevita Cristal [®] (RA).....	51

Resumo

O esteviosídeo é um adoçante natural proveniente das folhas de *Stevia rebaudiana*. Ele é um glicosídeo do esteviol e outros glicosídeos da mesma aglicona também estão presentes na planta e no produto comercial. O esteviosídeo é o componente majoritário do produto comercial, mas não é o que tem melhores propriedades organolépticas. Ele possui um amargor residual característico e, por isso, tentativas têm sido feitas no sentido de modificá-lo. Nesse trabalho o esteviosídeo comercial e o esteviosídeo puro foram submetidos à modificação por enzimas hidrolíticas obtidas do fungo filamentosso *Gibberella fujikuroi*. A produção das enzimas pelo fungo foi induzida através do seu cultivo em meio mínimo contendo esteviosídeo como única fonte de carbono e o extrato enzimático obtido foi então utilizado nos experimentos. Os produtos obtidos foram analisados por CLAE-EM-EM. Os resultados mostraram um significativo aumento de rebaudiosídeo A no produto final, o qual possui uma unidade a mais de glicose em relação ao esteviosídeo e melhores propriedades organolépticas. Além disso, foi observada uma redução na concentração do esteviol. A utilização de extrato de enzimas hidrolíticas do fungo *Gibberella fujikuroi*, portanto, é eficiente para a modificação do esteviosídeo e melhora suas características organolépticas.

Abstract

Stevioside is a natural sweetener obtained from the leaves of *Stevia rebaudiana*. It is a glycoside of steviol and other glycosides of the same aglicone are also found in the plant and in the commercial product. Stevioside is the major component in the commercial product but it is not the one with the best organoleptic properties. It has a characteristic bitter aftertaste and, for this reason attempts have been made in order to modify its molecule. In this work the commercial and pure stevioside were modified by hydrolytic enzymes from the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi*. The production of the enzymes by the fungus was induced by its culture in a medium containing stevioside as the sole carbon source and the enzymatic extract was then used in the experiments. The products obtained were analyzed by HPLC-MS-MS. The results showed a significant increase of rebaudioside A in the final product, which has an extra glucose unit when compared to stevioside and has better organoleptic properties. Furthermore a reduction in the concentration of steviol in the final product was also observed. The use of an extract of hydrolytic enzymes from the fungus *Gibberella fujikuroi* is, therefore, efficient for the modification of stevioside and enhance its organoleptic properties.

1 INTRODUÇÃO

O esteviosídeo é um adoçante natural extraído da *Stevia rebaudiana*. A expansão da aceitação do produto comercial tem sido comprometida pelos seus problemas organolépticos e algumas soluções têm sido propostas na literatura científica para resolvê-los. Uma delas se refere à modificação enzimática do produto. Esta estratégia está relacionada com as estruturas químicas do esteviosídeo e outros glicosídeos presentes no produto comercial. Os processos descritos procuram modificar enzimaticamente o esteviosídeo de modo a convertê-lo em rebaudiosídeo A, ou em outro derivado com unidades extra de açúcar na molécula. Este projeto pretende utilizar estratégia semelhante, aproveitando resultados preliminares encorajadores já obtidos pelo grupo de pesquisa com a utilização de enzimas hidrolíticas do fungo filamentosso *Gibberella fujikuroi*.

1.1 A PLANTA *STEVIA REBAUDIANA* (BERT.) BERTONI

A *Stevia rebaudiana*, também conhecida como: caá-hê-e, caá-jhe-hê, azuca-caá, eira-caá, caá-yupi, erva-adocida, folha-doce, planta-doce, yerba-dulce, capim-doce, erva-doce e estévia, possui imenso potencial adoçante devido à presença de esteviosídeo em suas folhas (LORENZI e MATOS, 2002). A planta tem o seguinte enquadramento taxonômico de acordo com a classificação de CRONQUIST, 1988:

Divisão: Magnoliophyta;

Classe: Magnoliopsida;

Subclasse: Asteridae;

Ordem: Asterales;

Família: Asteraceae;

Gênero e espécie: *S. rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

A *S. rebaudiana* é uma planta herbácea de caule ereto cujo comprimento, quando florido, pode variar de 20 a 80 cm, podendo excepcionalmente alcançar até cerca de 1 m de

altura. As regiões caulinares localizadas junto ao ápice do vegetal apresentam cor verde, ao passo que as basais são pardacentas (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 1 - A Folha de *Stevia rebaudiana*



FONTE: <http://www.pinnaclenature.com/images/stevialeaf.jpg>

As folhas (Fig.1) são opostas, espatuladas a lanceoladas, subsésseis a sésseis, de ápice agudo, base cuneada (atenuada) e margem serrilhada do meio ou do terço basal para o ápice foliar. Elas são alternas apenas quando junto à inflorescência. São trinervadas longitudinalmente, apresentando a nervura mediana mais desenvolvida. Apresentam consistência membranosa e são verde-escuras na parte superior (adaxial), sendo a parte inferior (abaxial) mais clara. Medem até 6 cm de comprimento por até 2,5 cm de largura. Algumas vezes a parte superior das folhas adquire tonalidade verde-azulada e lustrosa. As folhas são quebradiças quando secas e apresentam venação actinódroma. As folhas acham-se reunidas em capítulos agrupados em inflorescências terminais corimbiformes de coloração alvinetente. As flores são protegidas por um involúcro de cinco a seis brácteas (LORENZI e MATOS, 2002).

Os frutos são do tipo aquênio de tamanho reduzido, forma angular (quatro a cinco ângulos longitudinais) e têm superfície pilosa. Os frutos são acompanhados do papus formado por uma só fileira de cerdas (LORENZI e MATOS, 2002).

Na época da colonização da América do Sul pelos espanhóis e portugueses, nas imediações do território paraguaio e regiões circunvizinhas, como Brasil, Argentina e Bolívia, habitavam os índios nativos tupi-guaranis que constituíam uma população de aproximadamente 400 mil indivíduos. As plantas retiradas das florestas eram por eles utilizadas, principalmente, para adoçar bebidas medicamentosas já que suas folhas

apresentavam atividade extremamente doce. Embora conhecida dos índios e documentada pelos conquistadores espanhóis, conforme documentos mantidos pelo Arquivo Nacional de Assunção, somente em 1887 esta planta teve sua primeira abordagem científica feita pelo naturalista Moisés S. Bertoni, diretor do Colégio de Agricultura em Assunção, em uma de suas viagens às florestas do leste paraguaio. A partir de uma pequena amostra e alguns fragmentos de inflorescências o pesquisador determinou que a planta tinha certas características do gênero *Stevia* ou *Eupatorium*. Parte do material foi enviado ao químico paraguaio, Ovídio Rebaudi, que realizou os primeiros ensaios químicos sobre a planta, publicados em 1900, na revista *Argentina: Química e Farmácia*. Numa homenagem ao pesquisador, Bertoni havia denominado a planta de *Eupatorium rebaudiana*. Em 1905, após estudos botânicos mais aprofundados, Bertoni comprovou que se tratava realmente de uma *Eupatoriae*, porém do gênero *Stevia* e assim denominou-a de *Stevia rebaudiana*. Mais tarde a Sociedade Botânica do Paraguai denominou-a de *S. rebaudiana* Bertoni (EMBRAPA, 2004).

No Brasil foram encontradas quatro espécies, embora existam informações sobre a ocorrência de 14 espécies no Rio Grande do Sul. Das espécies que ocorrem no país merecem destaque a *S. rebaudiana* e a *S. aristata* que também apresenta princípios edulcorantes (EMBRAPA, 2004).

A *S. rebaudiana* é cultivada no Japão, América Central, China, Coréia, Israel, Taiwan, Tailândia, Indonésia e Filipinas. Na América é cultivada principalmente no Paraguai e no Brasil, mas também é cultivada na Argentina e no Uruguai (Fig.2) (MARCAVILLACA e TORTORELLI, 1992; ELKINS, 1997). A industrialização e consumo são liderados pelo Japão (41% dos adoçantes consumidos), seguido da Coréia do Sul, China e Brasil (KINGHORN et al, 2001).

Figura 2 - Localização dos maiores cultivos na América



FONTE: <http://nics.naro.affrc.go.jp/hatasaku/mihonen/maps/CROP28.gif>

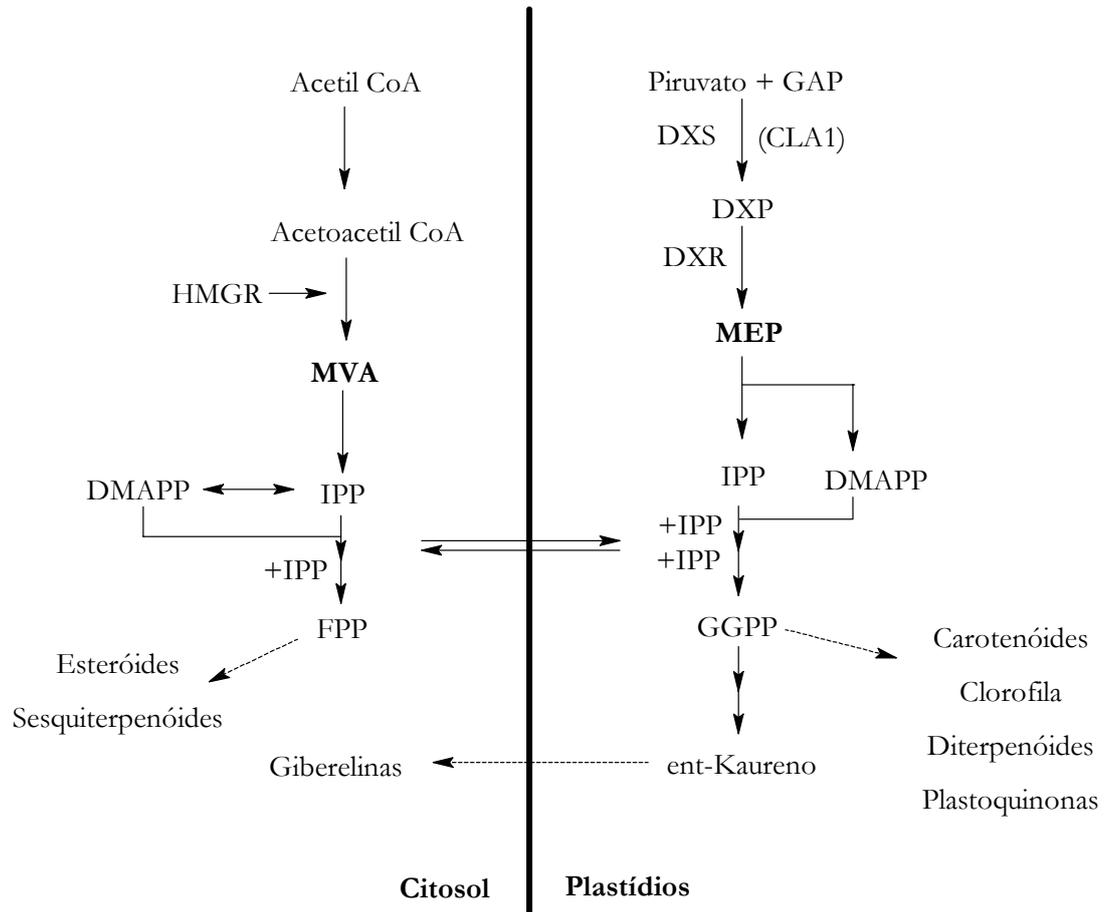
1.1.1 Constituintes químicos e características organolépticas da planta

A droga vegetal é constituída pelas folhas secas contendo, no mínimo, 12,0 % de carboidratos totais e 4,0 % de esteviosídeo (F.BRAS.IV, 2003). As folhas de *S. rebaudiana* também contêm proteínas, fibras, fósforo, zinco, cálcio, potássio, sódio, magnésio, flavonóides, vitaminas C e A entre outras (ELKINS, 1997). Nove glicosídeos doces do esteviol, um diterpeno tetracíclico, estão presentes nas folhas (Fig.4): esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo B, rebaudiosídeo C, rebaudiosídeo D, rebaudiosídeo E, rebaudiosídeo F e dulcosídeo A. Apenas o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A estão presentes em quantidades apreciáveis da matéria seca das folhas (CRAMMER e IKAN, 1987)

A biossíntese do esqueleto diterpênico começa, paralelamente à biossíntese de giberelinas, com a condensação do difosfato de dimetilalila (DMAPP) e três moléculas de difosfato de isopentenila (IPP), resultando em pirofosfato de geranylgeranila (GGPP). A GGPP é ciclizada e rearranjada para formar o *ent*-caureno. A conversão de IPP em *ent*-kaureno ocorre no cloroplasto. O *ent*-caureno é oxidado em passos subseqüentes para ácido *ent*-kaurenóico por monoxigenases microssomais. O ponto de ramificação com a biossíntese de giberelinas corresponde à hidroxilação deste ácido *ent*-kaurenóico no C-13 dando origem ao esteviol, o precursor dos glicosídeos diterpênicos da *S. rebaudiana* (TOTTE et al., 2000) (Fig.3). Subseqüentes glicosilações resultam em esteviolmonosídeo, esteviolbiosídeo, esteviosídeo e rebaudiosídeos, mas não foi encontrado trabalho experimental sobre essa seqüência de glicosilações. O que se sabe é que algumas enzimas atuantes na rota biossintética de formação do esteviol atuam também nestas subseqüentes glicosilações (RICHMAN et al., 1999).

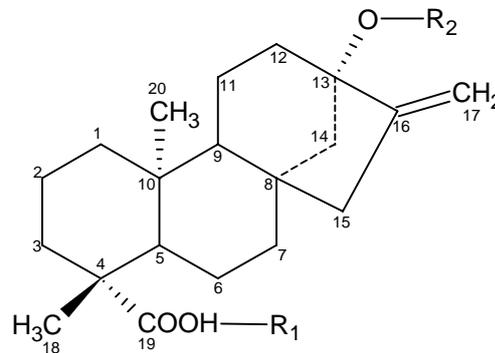
As características organolépticas são variáveis de acordo com a temperatura de utilização da planta. Em temperaturas mais altas o poder edulcorante é aumentado e o residual amargo é reduzido (CARDOSO et al., 2004). O gosto residual amargo também é reduzido quando a concentração na planta de rebaudiosídeo A aumenta em comparação ao esteviosídeo (GOTO e CLEMENTE, 1998).

Figura 3 - Rota de biossíntese de diterpenos



Nota: HMGR= 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase; MVA= mevalonato; IPP= difosfato de isopentenila; GGPP= difosfato de geranylgeranila; FPP= difosfato de farnesila; DXS= 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfatase sintase; DXP= 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfatase; DXR= 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfatase redutoisomerase; GAP= gliceraldeído-3-fosfato; DMAPP= difosfato de dimetilalila; MEP= metileritritol fosfato. (Fonte: KASAHARA et al, 2002).

Figura 4 - Esteviol e seus derivados

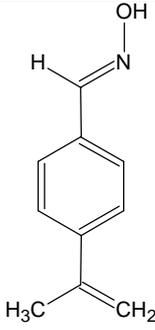
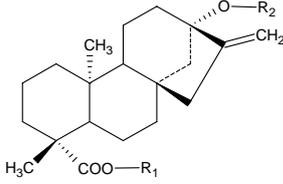
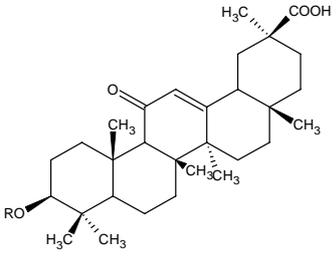


Composto	R1	R2
1 Esteviol	H	H
2 Esteviolbiosídeo	H	β - Glc - β - Glc (2→1)
3 Esteviosídeo	β - Glc	β - Glc - β - Glc (2→1)
4 Rebaudiosídeo A	β - Glc	β - Glc - β - Glc (2→1) β - Glc (3→1)
5 Rebaudiosídeo B	H	β - Glc - β - Glc (2→1) β - Glc (3→1)
6 Rebaudiosídeo C (Dulcosídeo B)	β - Glc	β - Glc - α - Rha (2→1) β - Glc (3→1)
7 Rebaudiosídeo D	β - Glc - β - Glc (2→1)	β - Glc - β - Glc (2→1) β - Glc (3→1)
8 Rebaudiosídeo E	β - Glc - β - Glc (2→1)	β - Glc - β - Glc (2→1) β - Glc - β - Xyl (2→1)
9 Rebaudiosídeo F	β - Glc	β - Glc - β - Xyl (2→1) β - Glc (3→1)
10 Dulcosídeo A	β - Glc	β - Glc - α - Rha (2→1)

FONTE: GEUNS, 2003

Dentre as plantas com poder edulcorante a *S. rebaudiana* produz glicosídeos de médio poder quando comparada com outras duas plantas produtoras de edulcorantes, mas ao contrário da *Perrilla frutescens*, ela produz princípios adoçantes em maior quantidade (Tab.1).

Tabela 1 - Comparação entre três plantas produtoras de princípios adoçantes

Nome Botânico e família	Princípio ativo adoçante	Estrutura química	Dulçor frente à sacarose	Origem da espécie (planta)
<i>P. frutescens</i> L. Labiatae	Grupo: Monoterpenóides (Perilartina)		400-2000	Índia, Japão e sudoeste da Ásia
<i>S. rebaudiana</i> Bert. (Bertoni) Asteraceae	Grupo: Diterpenóides (Esteviosídeo)		200-300	Paraguai e sul do Brasil
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. Leguminosae	Grupo: Triterpenóides (Glicirrizina e ácido glicirrízico)		100	Países do mediterrâneo e China

Fonte: DWIVEDI, 1999.

1.1.2 Farmacologia e toxicologia

O chá da planta, além de ser hipoglicemiante reduz o colesterol, estimula a regeneração celular e a coagulação sanguínea. Também foram evidenciadas outras ações como supressão do crescimento de tumores neoplásicos, propriedades coleréticas, antiinflamatórias, preventiva de úlceras no trato gastro intestinal (ZUBTSOV et al., 2002),

antioxidante (XI et al., 1998), anti rotavírus humano (TAKAHASHI et al., 2001) e preventivo de formação de placas de tártaro, cáries e infecções bucais (ELKINS, 1997). Além de adoçante a planta é considerada tônica para o coração, hipertensão, azia e para baixar os níveis de ácido úrico, sendo usada no Brasil como o adoçante mais apropriado para pessoas diabéticas (LORENZI e MATOS, 2002).

Estudos sobre os possíveis efeitos de mutagenicidade e genotoxicidade do extrato de estévia em, por exemplo, bactérias e diferentes espécies de mamíferos já foram relatados (SMIRNOVA, 2001; GEUNS, 2000; HUXTABLE, 2002). Estes estudos, baseados nos últimos 20 anos de utilização controlada no Japão e no Brasil demonstram que o extrato de estévia é seguro. O FDA (Food and Drug Administration), entretanto, exigiu que outros estudos fossem feitos em especial os de metabolismo do esteviosídeo e rebaudiosídeo A em humanos e em modelos animais bem como experimentos *in vitro* com o uso da microflora fecal animal.

Um dos estudos mais recentes nessa área comprovou, pela administração de esteviosídeo em hamsters, a presença de esteviol e de seu 16, 17-epóxido no sangue, fezes e urina dos animais (HUTAPEA et al, 1999).

Estudos *in vitro* demonstraram que as enzimas α -amilase, pepsina e pancreatina (HUTAPEA et al., 1997) e tecido hepático foram incapazes de hidrolizar o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A (ISHI-YAMAMOTO e BRACHE, 1995). Já a microflora humana hidrolizou completamente o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A em esteviol em 10 e 24 (vinte e quatro) horas, respectivamente, sem grande comprometimento da flora (GARDANA et al., 2003).

Estudos sobre fertilidade mostraram que não há alteração, em machos ou fêmeas, com o uso de esteviosídeo (SHIOTSU, 1996; MELIS, 1999; GEUNS, 2004). Com relação à carcinogenicidade tanto o esteviosídeo quanto o rebaudiosídeo A não se mostraram carcinogênicos em estudos prolongados; o esteviosídeo, ao contrário, reduziu a incidência de adenomas mamários e câncer de pele em ratos (TOYODA et al., 1997; YASUKAWA et al., 2002; KONISHIMA e TAKASAKI, 2002).

1.2 ESTEVIOSÍDEO

Quimicamente o esteviosídeo é um glicosídeo do esteviol, um diterpeno tetracíclico da classe dos cauranos. Ele é cerca de 250 a 400 vezes mais doce que a sacarose e, por isso, é utilizado como adoçante (EMBRAPA, 2004). Além do esteviosídeo a planta produz também outros glicosídeos (Fig.4; Tab.2). Os teores de esteviosídeo e dos outros compostos são: esteviosídeo 5-15% (250 a 400 vezes mais doce que a sacarose), rebaudiosídeo A 3-6% (350 a 450 vezes), rebaudiosídeo C ou dulcosídeo B (50 a 120 vezes) 1-2% e dulcosídeo A 0.5-1% (50 a 120 vezes). Outros glicosídeos que podem estar presentes são rebaudiosídeo D (200 a 300 vezes), rebaudiosídeo E (250 a 30 vezes) e esteviolbiosídeo (100 a 125 vezes). O rebaudiosídeo B (300 a 350 vezes mais doce que a sacarose) tem sido detectado, mas é provavelmente um artefato formado durante o isolamento. O teor de esteviosídeo aumenta até o início do florescimento, diminuindo continuamente até a produção de sementes, sendo aconselhável, portanto, a colheita das folhas no início da abertura das flores (EMBRAPA, 2004).

O esteviosídeo é produzido comercialmente no Brasil pela Steviafarma Industrial S/A na cidade de Maringá (PR). O processo de fabricação sofreu modificação com a finalidade de melhorar as características do produto final e não utilizar solventes para extração do adoçante, como preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e FDA. Basicamente o processo consistia em uma extração aquosa das folhas secas e o extrato aquoso era particionado com solvente orgânico (*n*-butanol). Após concentração do extrato orgânico o material cristalino era recristalizado e os cristais obtidos eram pulverizados. O novo processo consiste basicamente em substituir a extração com solvente por resinas de adsorção que realizam a limpeza do extrato aquoso. A solução é finalmente introduzida em um atomizador (“Spray-Dryer”) fornecendo o produto final como um pó fino.

Dentre as abordagens descritas para a melhoria das propriedades do esteviosídeo, a adição de novas unidades de açúcar à molécula é uma das que mais tem atraído a atenção. Esta estratégia se baseia na estrutura química do esteviosídeo (GEUNS, 2003) e de outras substâncias semelhantes também presentes nas folhas da *S. rebaudiana*. Estes compostos são glicosídeos, ou seja, eles possuem na sua molécula uma parte aglicona (esteviol) à qual estão

ligadas unidades de açúcar. Esses compostos diferem entre si no número e na posição das unidades de glucose ligadas ao esteviol.

Tabela 2 - Qualidade adoçante de alguns dos glicosídeos do esteviol

Glicosídeos do esteviol	Poder adoçante comparado à sacarose	Índice de Dulçor
Esteviosídeo	143	0
Rebaudiosídeo A	242	+2
Rebaudiosídeo C	Nd	-1
Rebaudiosídeo D	221	+3
Rebaudiosídeo E	174	+1
Dulcosídeo A	Nd	-2
Esteviolbiosídeo	<50	-3
Esteviolmosídeo	<50	-3

Fonte: TANAKA, 1997.

Nota: Nd: Não determinado.

Um desses glicosídeos, o rebaudiosídeo A, possui uma unidade de glucose a mais em relação ao esteviosídeo. Esta unidade extra de glucose faz uma grande diferença do ponto de vista de qualidade edulcorante. O rebaudiosídeo A é qualitativamente superior ao esteviosídeo. Apesar de presente na planta, o teor de rebaudiosídeo A é muito pequeno. Por isso, tentativas tem sido feitas na seleção de variedades de *S. rebaudiana* produtoras de maiores teores de rebaudiosídeo A. O esteviosídeo comercial com maior teor de rebaudiosídeo A tem melhores propriedades adoçantes. Estudos de solubilidade e sabor do adoçante final produzido também têm demonstrado que teores mais elevados de rebaudiosídeo A melhoram a solubilidade do produto de forma que para se alcançar solubilidade total do produto o teor mínimo de rebaudiosídeo A deve ser de 12,5 %, caso contrário temos precipitação do adoçante (GOTO e CLEMENTE, 1998).

A obtenção de esteviosídeo enriquecido com rebaudiosídeo A pode ser alcançada de várias formas como, por exemplo, a glicosilação do esteviosídeo catalizada por uma

transglicosilase específica (DAINIPPON INK & CHEM, 1987). A hidrólise seletiva do esteviosídeo comercial, através de uma glicosilase, de forma que a proporção rebaudiosídeo A: esteviosídeo seja aumentada é uma alternativa potencial.

1.2.1 Modificação enzimática do esteviosídeo

Várias enzimas de transglicosilação já foram usadas para este propósito como a pulanase, isomaltase, a β -galactosidase (KITAHAATA, 1989) e a dextrina dextranase (YAMAMOTO et al., 1994), com pululam, maltose, lactose e um hidrolizado parcial de milho, respectivamente; no entanto, o produto obtido tem remoção de somente parte do residual amargo. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) obtida do *Bacillus macerans* (FUKUNAGA et al., 1989), sendo que outros microrganismos como *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alcalophilus* e *Bacillus halophilus* também produzem bons resultados fazendo uso da mesma enzima.

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram que a hidrólise seletiva do esteviosídeo é possível (CHIMELLI, 2003). Foi obtido um complexo enzimático produzido pela *Gibberella fujikuroi*, que foi utilizado na modificação do esteviosídeo purificado. Análises cromatográficas dos produtos de hidrólise do esteviosídeo purificado com o extrato enzimático mostraram um aumento na relação rebaudiosídeo:esteviosídeo, além da formação de outros produtos que ainda não haviam sido caracterizados.

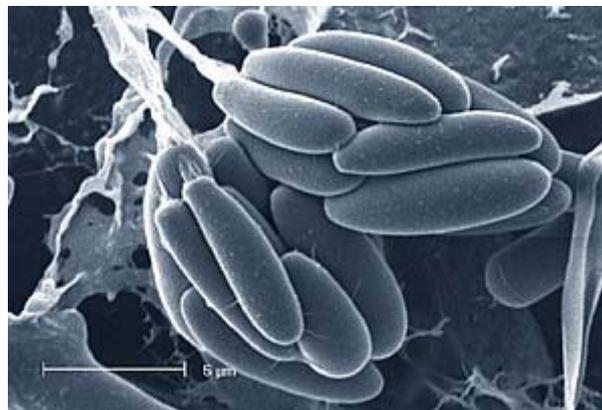
Trata-se de um problema analítico não trivial devido à inexistência de padrões cromatográficos obtíveis comercialmente. A solução mais trabalhosa e mais lenta seria o isolamento e caracterização de todos os componentes e posterior uso como padrões cromatográficos. A solução mais rápida e precisa seria a Cromatografia Líquida acoplada a Detector de Massas (CLAE-EM; MRM), que permite a determinação estrutural dos componentes através de seus espectros de massas. Com esta técnica é possível conseguir uma caracterização rápida e segura dos componentes da amostra final. Neste caso uma vantagem adicional é a da utilização dos resultados analíticos de alta confiabilidade nas

solicitações de licenciamento do eventual produto, junto a órgãos regulatórios, no Brasil e no exterior.

1.3 *GIBBERELLA FUJIKUROI*

A *G. fujikuroi* é um fungo que, no seu estado imperfeito produtor de esporos, foi denominado de *Fusarium moniliforme* (Fig.5).

Figura 5 - *Gibberella fujikuroi*



FONTE: <http://www.bccm.belspo.be/news/11-02/images/Fus04.jpg>

A *G. fujikuroi* tem como características a produção de giberelinas e carotenóides. As giberelinas são fito hormônios envolvidos na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas (MACMILLAN, 2002). Uma análise genética da biossíntese de giberelinas pelo gene “cluster” de nove espécies de *Fusarium* sp foi reportada dividindo-se em populações (variedades) (Tab.3).

Os pigmentos produzidos pela cepa de *G. fujikuroi* são carotenóides acumulados intracelularmente (LALE et al., 2006). Carotenóides são pigmentos terpenóides presentes em espécies fotossintéticas e alguns microrganismos não fotossintéticos, como bactérias e fungos (BRITTON et al., 1998; SANDMANN e MISAWA, 2002).

A população MP-C da *G. fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*) é uma das maiores produtoras de giberelinas (AVALOS et al., 1999; TUDZYNSKI, 1999). Além de giberelinas este fungo produz outros metabólitos secundários como carotenóides

(AVALOS, 1986), policetídeos como fusarina (BARRERO et al., 1991) e pigmento vermelho bikaverina (GIORDANO e DOMENECH, 1999).

Tabela 3 - Espécies de *Fusarium* sp e sua capacidade para síntese de giberelinas

Denominação das populações	Espécies de <i>Fusarium</i>	Presença do gene “cluster” produtor de Giberelina
MP-A	<i>F. verticillioides</i>	Presença de alguns genes responsáveis somente
MP-B	<i>F. sacchari</i>	Em sua totalidade
MP-C	<i>F. fujikuroi</i>	Em sua totalidade
MP-D	<i>F. proliferatum</i>	Em sua totalidade
MP-E	<i>F. subglutinans</i>	Em sua totalidade
MP-F	<i>F. thapsinum</i>	Em sua totalidade
MP-G	<i>F. nygamai</i>	Em sua totalidade
MP-H	<i>F. circinatum</i>	Presença de alguns genes responsáveis somente
MP-I	F. konzum	Em sua totalidade

FONTE: KAWAIDE, 2006.

NOTA: Em negrito estão as duas espécies utilizadas para produção de giberelinas em meio de cultura ICI.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Melhorar as características organolépticas do produto comercial, Stevita Cristal[®], utilizando o metabolismo enzimático do fungo filamentosso *Gibberella fujikuroi*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Isolar e purificar os componentes majoritários (rebaudiosídeo A e esteviosídeo) e sintetizar demais compostos (esteviol, isoesteviol, esteviolbiosídeo e rebaudiosídeo B) que não seja possível o isolamento em maior quantidade do produto comercial;
- Otimizar a limpeza das amostras em EFS (Extração em Fase Sólida);

-
- Otimizar a análise em CLAE, CLAE-EM e MRM dos compostos que serão utilizados como padrões cromatográficos;
 - Isolar e caracterizar o fungo filamentoso *G. fujikuroi*;
 - Realizar a biotransformação do esteviosídeo purificado e dos produtos comerciais;
 - Analisar os resultados obtidos

2 METODOLOGIA

2.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Autoclave FABBE, modelo 108, série 6779; Autoclave vertical marca Phoenix; Balança eletrônica analítica marca Ohaus, modelo Explorer; Balança eletrônica de prato superior marca Micronal, modelo B360; Banho ultra-sônico marca Unique, modelo USC700; Bomba hidropneumática marca Haskel, modelo DSTV150; Câmara Fluxo Laminar Vertical marca TROX, modelo FLV, série 293; Centrífuga refrigerada Sigma modelo 4K15, rotor no. 11156 121/00, tubos Falcon 50ml; Chromatotron; Destilador de água de vidro marca Marte, modelo MB 10.02; Estufa bacteriológica marca Fanem, modelo 002CB; Estufa microbiológica FABBE, modelo 108, série 6779; Estufa FANEM, modelo 315 SE; Fotomicroscópio Olympus, modelo CH30 e câmera acoplada Olympus, modelo PM-10AK3; Incubadora com agitação orbital termostatizada marca Tecnal, modelo TE421; Medidor de pH marca Quimis, modelo Q400A; Purificador de água marca Millipore, modelo Simplicity 185; Sistema de preparação de amostras a vácuo marca Varian, modelo Vac Elut 20; Sistema CLAE, marca VARIAN (bomba quaternária modelo 9012, injetor automático modelo AI200, detector de arranjo de fotodiodos, modelo 9065, coluna C₁₈ de 150 x 4,6mm); Sistema CLAE-EM/EM Applied Biosystems/MDS Sciex (bomba quaternária, espectrofotômetro de massas triploquadrupolar API 3000TM, bomba de infusão Harvard Apparatus; software Analyst[®] versão 1.4.1) – LACEN/PR; Os solventes utilizados foram de grau analítico (destilados) e grau HPLC Merck (CLAE; CLAE-EM-EM; MRM).

2.2 CROMATOGRAFIA

Cromatografia em camada delgada (CCD): foram utilizadas placas preparadas de sílica gel (Sigma-Aldrich, Cat. 818133, lot. 304098). As manchas foram visualizadas utilizando ácido sulfúrico:metanol (50:50) seguido de aquecimento.

Cromatografia em coluna (CC): foram utilizadas colunas de vidro (28x5 cm) com saída lateral inferior para vácuo. A fase estacionária (85,0 g) Sílica Gel 60-H (Merck, 500 a 600 mesh, 2 a 25 μm) ou Sílica Flash (Sigma-Aldrich, 230 a 400 mesh, 0,040 a 0,063 mm) foi empacotada à vácuo com auxílio da fase móvel (diclorometano, metanol, água; 73:23:4).

Cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC, Chromatotron[®]): foram utilizadas placas circulares (rotores) com uma camada de 2 mm de sílica gel 60 PF254 (Merck, 5 a 40 μm).

2.2.1 Análise por CLAE

Foi utilizado sistema descrito em Equipamentos e Materiais. A otimização da fase móvel (acetonitrila:água acidulada) foi feita através da variação das proporções de seus componentes e dos tempos de gradiente.

2.2.2 Análise por CLAE-EM-EM

Foi utilizado o sistema descrito em Equipamentos e Materiais. O espectrofotômetro de massas foi operado com ionização por “electrospray”, no modo negativo, a 100 °C. A voltagem do capilar foi otimizada à -4500 V, com um potencial de orifício (“Declustering Potencial” – DP) de -50 V. Nitrogênio foi usado como gás de colisão (“CAD Gas”) e gás de dessolvatação (“Curtain GasTM”) às pressões respectivas de 6,0 e 9,0 psi. Ar sintético ultrapuro foi empregado como gás nebulizante (“GS1”) e como gás secante aquecido (“GS2”) à pressão de 6,0 psi. A bomba de infusão trabalhou num volume de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. A amostra foi diluída em acetonitrila:água (80:20) e preparada para infusão com acetato de amônio 5 mM.

As condições para a análise no espectrômetro de massas (MS1) foram: modo negativo, fonte de ionização “turbo spray”, gás nebulizador a 8 psi, gás de solvatação a 9 psi, “ion spray” a -4500.0 volts, potencial de orifício a -50 volts. As condições para a análise de MS2 foram às mesmas do MS1, sendo gás de colisão a 4 psi e energia de colisão - 80 volts.

2.3 OBTENÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A

2.3.1 Purificação por cromatografia em coluna

Uma coluna foi empacotada com sílica (85,0 g) e condicionada com a mesma fase móvel utilizada para cromatografia de camada delgada. O produto comercial (5 g), previamente dissolvido na fase móvel, foi adicionado e a eluição foi feita à vácuo. Após análise por CCD as frações semelhantes foram reunidas e o solvente foi evaporado em rotavapor. Após várias tentativas com diferentes condições a separação não foi satisfatória.

2.3.2 Purificação por cromatografia circular centrífuga (Chromatotron®)

O esteviosídeo comercial (500 mg) foi dissolvido na fase móvel e aplicado em rotor previamente ativado e seco. As frações (10 ml) semelhantes (CCD) foram reunidas e o solvente foi evaporado. Os produtos obtidos foram recristalizados em metanol e submetidos a análises espectrópicas e os dados comparados com os da literatura.

a) Esteviosídeo:

EM: 803,4 uma (MS1); 640,4 uma; 479,6 uma; 317,5 uma (MS2) (Fig.36 e 37).

IV (cm^{-1}): 3388 (hidroxila), 2937 (ligação C-H de carbono sp^3), 2883 (ligação C-H de carbono sp^3), 1735 (carbonila), 1660 (ligação dupla entre carbonos), 1446 (deformação assimétrica de grupo metila), 1367 (deformação simétrica de grupo metila), 1076 (ligação C-O), 895 (deformação fora do plano de ligação C-H em sistema olefínico, indica também que um dos carbonos da ligação dupla está totalmente substituído e que o outro suporta dois hidrogênios geminais) (Fig.38).

RMN ^1H (200 MHz) em DMSO-d_6 δ : 0,60 a 2,20 (H aglicona, exceto os de ligação dupla); 0,87 (3H ligados C20); 1,14 (3H ligados C18) 2,09 (residual de acetona); 2,51(solvente); 2,80 a 5,80 (hidrogênios alquílicos das glicoses, hidrogênios das hidroxilas e ligados aos carbonos sp^2 da ligação dupla); 3,41 (água) (Fig.39).

RMN ^{13}C (50 MHz) δ : 18,6 (C-2); 37,3 (C-3); 43,1 (C-4); 56,4 (C-5); 21,1 (C-6); 41,9 (C-8); 53,0 (C-9); 19,9 (C-11); 35,5 (C-12); 84,5 (C-13); 43,4 (C-14); 46,8 (C-15); 153,4 (C-16); 103,8 (C-17); 28,0 (C-18); 175,6 (C-19); 15,0 (C-20); 94,0 (C-1'); 72,4 (C-2'); 77,5 (C-3'); 69,6 (C-4'); 60,4 (C-6'); 96,3 (C-1''); 82,5 (C-2''); 70,2 (C-4''); 76,1 (C-5''); 60,9 (C-

6'); 104,5 (C-1''); 75,2 (C-2''); 75,9 (C-3''); 69,4 (C-4''); 76,8 (C-5''); 60,6 (C-6'') (Fig.40).

b) Rebaudiosídeo A:

EM: 965,4 uma (MS1); 803,6 uma; 640,5 uma; 479,5 uma; 317,5 uma (MS2) (Fig.41 e 42).

2.4 OBTENÇÃO DO ESTEVIOLBIOSÍDEO E REBAUDIOSÍDEO B

O esteviosídeo comercial (4,4 g) foi dissolvido em uma solução de hidróxido de potássio 10% e aquecido sob refluxo por 1 hora. Após resfriamento a mistura foi acidificada com ácido acético glacial e o precipitado formado foi removido por filtração à vácuo. O resíduo foi então fracionado por cromatografia em camada delgada centrífuga circular (Chromatotron[®]). As frações semelhantes foram recolhidas após análise por CCD e os solventes foram evaporados em rotavapor. Os produtos obtidos foram submetidos à análises espectrópicas e os dados comparados com os da literatura.

a) Esteviolbiosídeo

EM: 641,4 uma (MS1); 479,3 uma; 317,5 uma (MS2) (Fig.43 e 44).

IV (cm⁻¹): 3410 (hidroxila), 2987 (ligação C-H de carbono sp³), 2941 (ligação C-H de carbono sp³), 1693 (carboxila), 1641 (ligação dupla entre carbonos), 1448 (deformação assimétrica de grupo metila), 1365 (deformação simétrica de grupo metila), 1076 (ligação C-O), 895 (deformação fora do plano de ligação C-H em sistema olefínico, indica também que um dos carbonos da ligação dupla está totalmente substituído e que o outro suporta dois hidrogênios geminais) (Fig.45).

RMN ¹H (200 MHz) em DMSO-d₆: 0,88 (3H ligados C20); 1,10 (3H ligados C18); 0,60 a 2,20 (H aglicona, exceto os de ligação dupla); 2,80 a 4,60 (hidrogênios alquílicos das glicoses, hidrogênios das hidroxilas e ligados aos carbonos sp² da ligação dupla) (Fig.46).

RMN ¹³C (50 MHz) δ: 18,8 (C-2); 37,5 (C-3); 42,7 (C-4); 55,9 (C-5); 21,6 (C-6); 41,7 (C-8); 53,2 (C-9); 19,8 (C-11); 36,2 (C-12); 84,9 (C-13); 43,6 (C-14); 47,1 (C-15); 153,0 (C-16); 104,2 (C-17); 28,2 (C-18); 178,5 (C-19); 15,1 (C-20); 96,1 (C-1'); 82,5 (C-2'); 76,0 (C-5'); 60,9 (C-6'); 104,4 (C-1''); 75,2 (C-2''); 76,2 (C-3''); 69,9 (C-4''); 76,8 (C-5'') (Fig.47)

b) Rebaudiosídeo B

EM: 803,4 uma (MS1); 641,1 uma; 479,4 uma; 317,1 uma (MS2) (Fig.48 e 49).

2.5 OBTENÇÃO DO ESTEVIOL

O esteviosídeo (100 g) foi dissolvido em água destilada (500 ml), periodato de sódio (15 g) foi adicionado e a solução foi deixada em repouso, no escuro, por 16 horas. A mistura foi então basificada com hidróxido de sódio até pH 12 (~ 7,5 g) e aquecido sob refluxo por uma hora. A mistura foi resfriada, acidificada lentamente ácido acético, até pH 4 e extraída imediatamente com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com bissulfito de sódio 5 % e água destilada e depois seca com sulfato de sódio anidro. Depois da evaporação do solvente o produto foi recristalizado com metanol, submetido a análises espectrópicas e os dados comparados com os da literatura.

EM: 317,3 uma (MS1); 259,0 uma; 245,5 uma (MS2) (Fig.50 e 51)

IV (cm⁻¹): 3462 (hidroxila), 3277 (hidroxila), 2993 (ligação C-H de carbono sp³), 2949 (ligação C-H de carbono sp³), 1691 (carboxila), 1465 (deformação assimétrica de grupo metila), 1396 (deformação simétrica de grupo metila), 1238 (ligação C-O), 1188 (ligação C-O), 1093 (ligação C-O), 879 (deformação fora do plano de ligação C-H em sistema olefínico, indica também que um dos carbonos da ligação dupla está totalmente substituído e que o outro suporta dois hidrogênios geminais) (Fig.52).

RMN ¹H (200 MHz) em DMSO-d₆: 0,98 (3H ligados C20); 1,19 (3H ligados C18); 0,80 a 2,20 (H aglicona, exceto os de ligação dupla) (Fig.53).

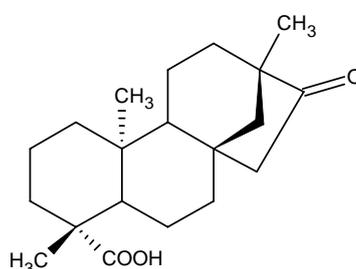
RMN ¹³C (50 MHz) δ: 41,5 (C-1); 19,9 (C-2); 38,8 (C-3); 44,0 (C-4); 57,5 (C-5); 22,8 (C-6); 42,3 (C-7); 49,7 (C-8); 54,8 (C-9); 40,2 (C-10); 21,1 (C-11); 40,8 (C-12); 80,1 (C-13); 47,5 (C-14); 48,5 (C-15); 157,4 (C-16); 102,9 (C-17); 29,2 (C-18); 179,0 (C-19); 16,1 (C-20) (Fig.54).

2.6 OBTENÇÃO DO ISOESTEVIOL

O esteviosídeo comercial (10,0 g) foi lavado com metanol (50 ml), filtrado e o resíduo foi dissolvido em água destilada (50 ml). Ácido clorídrico concentrado (5 ml) foi

acrescentado e a mistura foi aquecida sob refluxo por um 1 hora. Após resfriamento a mistura foi deixada na geladeira até o dia seguinte. A mistura foi filtrada à vácuo e o resíduo lavado com água gelada. O produto remanescente na fase aquosa foi recuperado através de extração com diclorometano (3 x 150ml). As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado e o composto recristalizado com metanol. O isoesteviol (Fig.6) foi então analisado por espectroscopia e os dados comparados com os da literatura.

Figura 6 - Estrutura do isoesteviol



EM: 317,3 uma (MS1) (Fig.55)

IV (cm⁻¹): 3454 (hidroxila), 2956 (ligação C-H de carbono sp³), 2922 (ligação C-H de carbono sp³), 2846 (ligação C-H de carbono sp³), 1737 (carbonila da cetona), 1693 (carboxila), 1454 (deformação assimétrica de grupo metila), 1373 (deformação simétrica de grupo metila), 1269 (ligação C-O), 1180 (ligação C-O) (Fig.56).

RMN ¹H (200 MHz) em DMSO-d₆: 0,83 (3H ligados C20); 0,94 (3H ligados C17); 1,20 (3H ligados C18); 0,80 a 2,20 (H esqueleto diterpênico); 2,60 (H 15 α) (Fig.57).

RMN ¹³C (50 MHz) δ: 41,1 (C-1); 20,1 (C-2); 39,0 (C-3); 44,6 (C-4); 58,1 (C-5); 22,9 (C-6); 42,4 (C-7); 55,8 (C-9); 39,2 (C-10); 21,4 (C-11); 38,4 (C-12); 40,7 (C-13); 55,2 (C-14); 20,2 (C-17); 29,5 (C18); 181,4 (C-19); 14,0 (C-20) (Fig.58).

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Soluções concentradas (2 mg/ml) de esteviol, isoesteviol, esteviosídeo, rebaudiosídeos A e B, e esteviolbiosídeo foram impregnados (20 µl) em discos previamente esterilizados (Schleicher & Schuell MicroScience, Cód.740-E, Lot. FE013). Estes discos

foram aplicados em placas de ágar sangue (cinco discos por placa), em triplicata, com auxílio de materiais estéreis e em câmara de fluxo laminar. Foram realizados os controles dos solventes aplicados para solubilização das amostras (acetonitrila e água) e controles positivo (*Staphylococcus* sp.) e negativo (água). As placas foram deixadas em estufa à 25 °C por 48 horas e depois analisadas.

2.8 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *GIBBERELLA FUJIKUROI*

2.8.1 Isolamento

Os meios de cultura Ágar Sabouraud modificado com glicose e Ágar YPG 2 % foram preparados e esterilizados em vapor fluyente.

Ágar Sabouraud modificado (g/L): peptona (10,0 g); glucose (40,0 g); ágar (20,0 g); solução de elementos-traço (2 ml).

Ágar YPG 2% (g/L): glucose (20,0 g); Extrato de levedura (10,0 g); Peptona (10,0 g); Ágar (15,0 g).

Solução de elementos-traço (g/100ml): Ácido cítrico monohidratado (5,00 g); ZnSO₄.7H₂O (5,00 g); Fe(NH₄)₂.SO₄.6H₂O (1,00 g); CuSO₄.5H₂O (0,25 g); MnSO₄.1H₂O (0,05 g); H₃BO₄ anidro (0,05 g); Na₂MoO₄.2H₂O (0,05 g).

Com auxílio de agulha estéril foi recolhida pequena porção de micélios da cepa de *G. fujikuroi* do interior do tubo de ensaio contendo a cultura e inoculada no ágar. Esta operação foi realizada de modo que em cada placa tivemos cinco pontos de inoculação com distâncias equivalentes entre si. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 7 dias. O procedimento foi repetido até obtenção da cepa purificada de *G. fujikuroi*.

2.8.2 Conservação da cepa

As cepas de *G. fujikuroi* foram identificadas pelas suas características macroscópicas, microscópicas e bioquímicas (produção de giberelinas). Para conservação

estas cepas foram repicadas, a cada três meses, em ágar Sabouraud modificado. Após inoculação foram incubadas a 28 °C por quatro dias e então conservadas em geladeira (4 °C).

Ágar Sabouraud modificado (g/L): Peptona (10,0 g); Sacarose (40,0 g); Ágar (20,0 g); Solução de elementos-traço (2 ml).

2.8.3 Ativação da cepa e verificação da produção de pigmentos

A cepa isolada foi repicada para meio de cultura Ágar Sabouraud modificado com glicose e YPG 2 % e incubada por um período de 15 dias a 28 °C. Este processo de repique foi repetido para que a cepa de *G. fujikuroi* produzisse as colorações (os pigmentos carotenóides) características. Completado o último período de crescimento a cepa foi repicada para Ágar Sabouraud modificado com sacarose como fonte de carboidrato e então incubada novamente a 28 °C por um período de 15 dias. A inoculação foi feita em tubo inclinado e em placa. Decorrido o período a cepa foi caracterizada. A produção de pigmentos é característica da *Gibberella* sp., bem como, a produção de giberelinas ambas mencionadas na introdução do trabalho.

2.8.4 Verificação da produção de giberelinas

O fungo ativado foi inoculado em meio ICI (BORROW et al., 1955), com a composição mostrada abaixo, e o pH foi ajustado para 5,0.

Esteviosídeo purificado	40,0 g	Stevita Cristal® (SE/RA)	80,0 g
Nitrato de amônio	2,4 g	Nitrato de amônio	2,4 g
Fosfato de potássio dibásico	5,0 g	Fosfato de potássio dibásico	5,0 g
Sulfato de magnésio.10H ₂ O	1,0 g	Sulfato de magnésio.10H ₂ O	1,0 g
Solução de Elementos-traço	2,0 ml	Solução de Elementos-traço	2,0 ml
Água destilada (qsp)	1000 ml	Água destilada (qsp)	1000 ml

Estes frascos (triplicata para cada fonte de carbono) foram então dispostos em uma incubadora com agitação orbital na temperatura de 28 °C, a 140 rotações por minuto. Ao final de 10 dias (tempo de incubação foi verificado nos tempos de 24 h, 48 h, 5, 10 dias) o material foi filtrado a vácuo, a biomassa retida no filtro foi lavada com acetato de etila (50 ml) e seca a 70 °C até peso constante. O filtrado aquoso foi extraído com acetato de etila (3x50 ml), as fases orgânicas foram agrupadas, secas e o solvente evaporado.

As seis amostras obtidas foram redissolvidas em acetonitrila:água 70:30 (3 ml), as soluções foram então limpas em seringas com sílica C₁₈ (500 mg), fazendo uso da técnica de extração em fase sólida (EFS) e a eluição das giberelinas foi realizada com a mesma mistura solvente. As amostras foram então analisadas por CCD e por CLAE e comparadas com padrão de GA₃. A análise por CCD foi realizada utilizando a fase móvel clorofórmio:acetato de etila:ácido acético glacial (60:39,5:0,5). A análise por CLAE foi realizada utilizando coluna C₁₈ (150 x 4,6 mm), com fluxo de 1 ml/min e o eluato foi monitorado a 205 nm. A programação do gradiente utilizada está resumida na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições para análise de GA₃ por CLAE

Tempo (min)	Solventes utilizados	
	Acetonitrila	Água (pH 3,0 com H ₃ PO ₄)
Inicial	30%	70%
6,00	30%	70%
6,01	90%	10%
13,00	90%	10%

2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPONENTES DO ESTEVIOSÍDEO COMERCIAL

Foi utilizado o método de suspensão direta de colônias. As colônias dos microorganismos utilizados foram suspensas em solução salina e a turbidez das suspensões foi ajustada para o equivalente ao padrão 0,5 de McFarland. As placas com os meios de cultura, ágar soja tripticaseína para bactérias e ágar Sabouraud dextrosado para fungos, foram preparadas e inoculadas com os microorganismos.

Os discos de papel (Schleicher & Schuell MicroScience, Cód.740-E) previamente autoclavados foram impregnados com 30 µl da solução de cada substância (esteviosídeo, esteviolbiosídeo, esteviol, isoesteviol, rebaudiosídeos A e B e amoxicilina) e pressionados firmemente sobre a superfície do ágar previamente inoculados. As placas foram incubadas da seguinte forma: 35 °C por 16 a 18 horas (bactérias) ou a 25 °C por 5 dias (fungos). As zonas de inibição foram medidas com um paquímetro.

As cepas selecionadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 - IAL 1606), *Escherichia coli* (ATCC 11229 - IAL 2074); *Salmonella choleraesuis* var. typhimurium (ATCC 14028 - IAL 2364); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442 - IAL 1853); *Candida albicans* (ATCC 10231 - IAL 2083); *Gibberella fujikuroi* (ATCC 12616). Elas foram previamente ativadas em caldo Sabouraud (fungos) e caldo soja tripticaseína (Bactérias).

Os meios de cultura utilizados foram Ágar Soja Trypticaseína (Biobrás Diagnósticos, produto 108-1), Ágar Sabouraud Dextrosado (Biobrás Diagnósticos, produto 107-1), Caldo Peptona de Caseína-Peptona de Soja (Merck), Caldo Sabouraud Dextrosado (Biobrás Diagnósticos, produto 224-1).

Esta metodologia é baseada no Manual de provas de susceptibilidade antimicrobiana/OMS.

2.10 OBTENÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Foram preparados cinco frascos erlenmeyers cada um contendo meio ICI modificado (50 ml) tendo esteviosídeo como única fonte de carbono. Após autoclavação três frascos foram inoculados com *G. fujikuroi* e os outros dois frascos foram utilizados para controle. Os frascos foram agitados a 140 rpm e a 28 °C por 14 dias. O conteúdo dos frascos foi então centrifugado e ao sobrenadante foi adicionada acetona (20 ml) a 4 °C. As proteínas precipitadas foram separadas e o sobrenadante foi novamente centrifugado. O extrato bruto enzimático foi então redissolvido em meio ICI e armazenado na geladeira para uso posterior.

O meio de cultura utilizado para o experimento foi o ICI, com a seguinte composição (BORROW et al., 1955) (g/L): Glicose (80,0 g); Nitrato de amônio (2,4 g);

Fosfato de potássio dibásico (5,0 g); Sulfato de magnésio.10H₂O (1,0 g); Sol. Elementos-traço (2,0 ml). O pH deve foi ajustado para 5,0 (cinco).

2.11 MODIFICAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO

O meio de cultura ICI, modificado com a substituição da glicose por esteviosídeo puro (80,0 g) ou esteviosídeo comercial (100,0 g), foi preparado, distribuído em Erlenmeyers de 250 ml (50 ml cada) e os frascos foram autoclavados em vapor flúente. Após adição do extrato enzimático (5 ml) os frascos foram agitados a 28 °C e a 140 rpm. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 2, 5 , 7 e 15 dias. Elas foram limpas por extração em fase sólida e analisadas por CLAE.

2.12 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Foi realizada otimização para o procedimento de limpeza da amostra para SPE variando-se as porcentagens de composição acetonitrila:água da fase móvel bem como quantidade de amostra a ser aplicada por mg da sílica em questão, quantidade de solvente a ser eluído e procedimentos de limpeza e ativação da sílica.

Tabela 5 - Condições utilizadas para análise por CLAE do metabólito produzido

Tempo (min)	Solventes utilizados	
	Acetonitrila	Água (pH 3,0 com H ₃ PO ₄)
Inicial	30%	70%
3,50	30%	70%
3,51	40%	60%
10,00	90%	10%

NOTA: Fluxo de 1ml/min

A otimização resultou nos seguintes parâmetros: para 500 mg de sílica C₁₈ aplicar não mais que 250 µg de amostra em um volume de solução não maior que 5 ml. O

procedimento de limpeza da coluna consistiu em passagem de 10 ml de acetonitrila e a ativação também requereu igual volume de água. Para eluição dos analitos a fase móvel com maior recuperação para os compostos em questão consistiu de acetonitrila:água (65:35). Volumes de 5 ml foram utilizados para a eluição dos analitos. A fase móvel de acetonitrila : água foi alterada chegando a melhor separação na seguinte proporção apresentada na Tabela 5.

2.13 ANÁLISE DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A POR MRM

As análises foram realizadas em sistema de CLAE-EM/EM. O espectrômetro de massas foi operado em modo MRM (Múltipla Reação Monitorada) com ionização por “electrospray”, no modo de íons negativo à 450 °C. A voltagem do capilar foi otimizada à -4.500V, com um potencial de orifício (“Declustering Potential” - DP) de -80V. Nitrogênio foi utilizado como gás de colisão (“CAD Gas”) e gás de dessolvatação (“Curtain GasTM”) às pressões respectivas de 7,0 e 9,0 psi. Ar sintético ultrapuro foi empregado como gás nebulizante (“GS1”) e gás secante aquecido (“GS2”) à pressão de 12,0 psi. A bomba de infusão trabalhou num volume de 10 µl/min. A amostra foi diluída em acetonitrila:água (80:20) e preparada para infusão com acetato de amônio 5 mM.

2.14 CARACTERIZAÇÃO DO ESTEVIOLMONOSÍDEO

A caracterização do esteviolmonosídeo foi realizada com auxílio do CLAE-EM-EM após a obtenção dos cromatogramas de biotransformação, nos quais obtivemos compostos majoritários que foram analisados permitindo a identificação do esteviolmonosídeo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O esteviosídeo comercial tem cerca de 150 componentes. Para avaliar a modificação enzimática que o extrato enzimático da *G. fujikuroi* fez no esteviosídeo foi necessário obter o esteviosídeo puro bem como outros glicosídeos do esteviol, para utilizá-los como padrões cromatográficos.

3.1 OBTENÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A

A obtenção do esteviosídeo puro a partir do produto comercial foi feita através de cromatografia em coluna e por cromatografia em camada delgada centrífuga utilizando o Chromatotron[®]. O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A obtidos foram caracterizados por métodos espectrométricos e por comparação com dados da literatura.

Inicialmente foi feita a separação por cromatografia em coluna, pois era necessária uma quantidade considerável de esteviosídeo purificado. Utilizando a sílica gel 60H e com eluição à vácuo o resultado não foi satisfatório (baixa resolução). Talvez isso tenha ocorrido devido ao elevado tempo de eluição por causa da viscosidade da fase móvel (diclorometano:metanol:água; 73:23:4) e do pequeno tamanho de partícula da sílica. Em outra tentativa foi utilizada sílica flash também com eluição à vácuo e com a mesma fase móvel. A eluição foi mais rápida e a separação melhor mas ainda insuficiente para obtenção dos produtos isolados em uma única corrida cromatográfica.

O segundo método preparativo foi o de cromatografia em camada delgada centrífuga (Chromatotron[®]) que tem menor capacidade do que CC, mas possui melhor resolução devido ao pequeno tamanho de partícula da sílica utilizada. As amostras (300 mg a 500 mg) foram aplicadas em placa de 2 mm de espessura. Para eluição foram utilizadas misturas de acetato de etila, metanol, água e acetato de etila, propanol, água. A fase móvel de escolha foi acetato de etila:metanol:água (81,3:10,6:8,1) e a separação foi adequada.

Para aumentar o rendimento da separação resolvemos fazer uma pré-purificação do produto comercial através da lavagem com metanol e posterior recristalização no

mesmo solvente. Esse procedimento foi suficiente para remover boa parte de pigmentos remanescentes no produto comercial.

O material separado por Chromatotron[®] foi dividido em três frações maiores. A primeira que deveria conter o rebaudiosídeo, a segunda que deveria conter rebaudiosídeo e esteviosídeo e a terceira que deveria conter esteviosídeo. A primeira e a terceira amostras foram evaporadas em rotavapor. A terceira amostra (esteviosídeo) foi analisada por CCD em conjunto com padrão comercial que comprovou a identidade do material em questão. Desta forma foram processadas as separações até que se obtivesse esteviosídeo isolado suficiente para as demais análises.

As amostras de esteviosídeo (Fig. 7) e rebaudiosídeo A (Fig. 8) obtidas foram analisadas por CLAE para comprovação de sua pureza. A eluição foi realizada com fluxo de 1 ml/min e em gradiente de acordo a Tabela 6.

Tabela 6 - Condições para análise dos compostos isolados em CLAE

Tempo (min)	Solvente	
	Acetonitrila	Água (pH 3,0 com H ₃ PO ₄)
Inicial	30%	70%
3,50	30%	70%
3,51	40%	60%
10,00	90%	10%

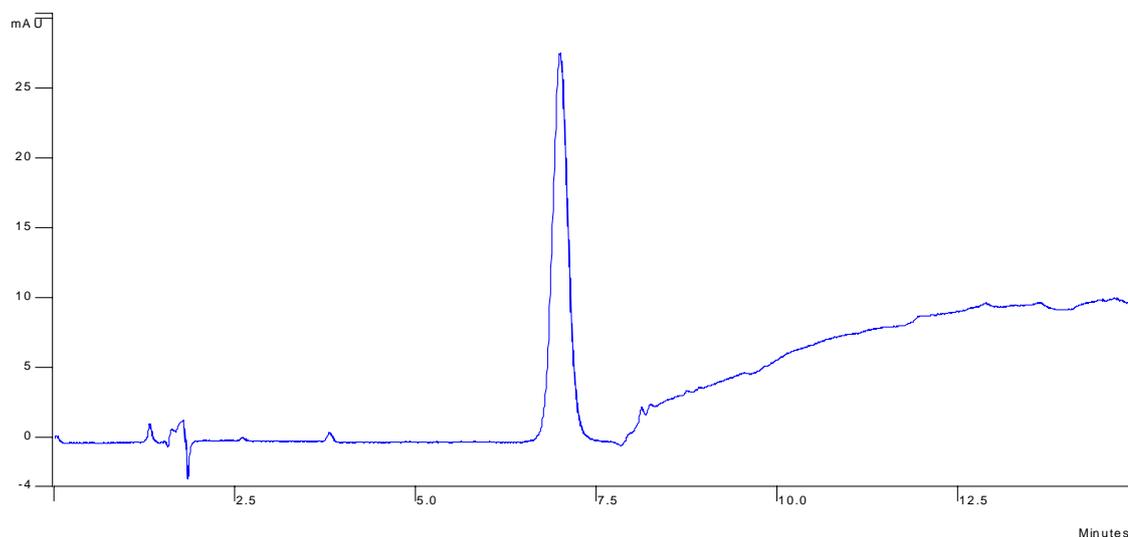
Após comprovação de pureza do composto pelo CLAE as amostras foram analisadas por CLAE-EM e foram obtidos os resultados a seguir.

Na Figura 36 pode-se observar o sinal correspondente ao esteviosídeo (803,4 uma) ionizado em modo negativo [M-H]⁻. O sinal em 863,3 uma corresponde ao aduto de acetato [M+CH₃COO]⁻.

Na Figura 37 não se pôde observar o sinal correspondente ao esteviosídeo (803,4 uma) (MS2), pois o mesmo foi totalmente fragmentado pela alta energia de colisão fornecida. Os fragmentos a serem analisados são: 640,4 uma; 479,6 uma e 317,5 uma e são indicativos da perda das três moléculas de glicose em configuração β com retenção de

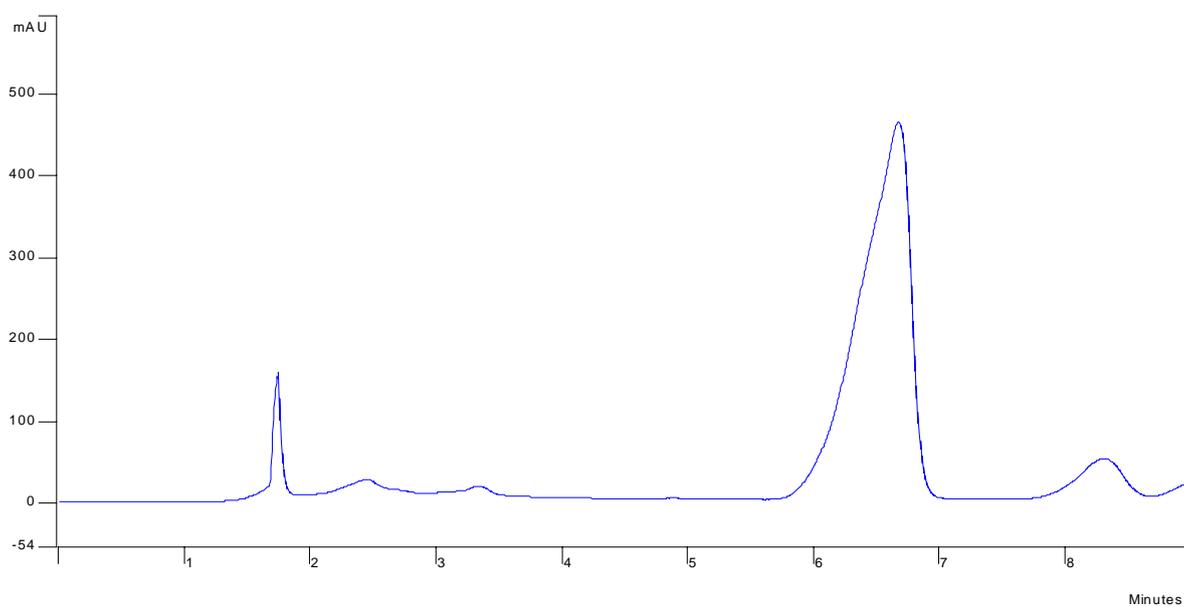
oxigênio pela molécula a ser fragmentada. O último fragmento (317,5 uma) corresponde à estrutura do esteviol altamente estável.

Figura 7 - Cromatograma por CLAE do esteviosídeo



Nota: Condições de análise: Tabela 6

Figura 8 - Cromatograma por CLAE do rebaudiosídeo A



Nota: Condições de análise: Tabela 6

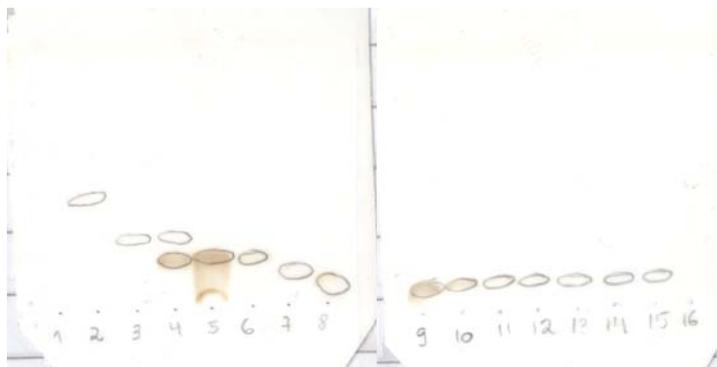
Na Figura 41 pôde-se observar o sinal correspondente ao rebaudiosídeo A (965,4 uma) ionizado em modo negativo $[M-H]^-$. O sinal em 1025,0 uma representa um aduto de acetato $[M+CH_3COO]^-$.

Na Figura 42 não foi observado o sinal correspondente ao rebaudiosídeo A (965,4 uma) (MS2), pois o mesmo foi totalmente fragmentado pela alta energia de colisão fornecida. Os fragmentos a serem analisados são: 803,6 uma, 641,5 uma, 479,5 uma, 317,5 uma e são indicativos da perda das quatro moléculas de glicose em configuração β com retenção de oxigênio pela molécula a ser fragmentada. O último fragmento (317,5 uma) corresponde à estrutura do esteviol altamente estável. As condições ofertadas foram às estabelecidas na metodologia com exceção do gás de colisão: 6 psi.

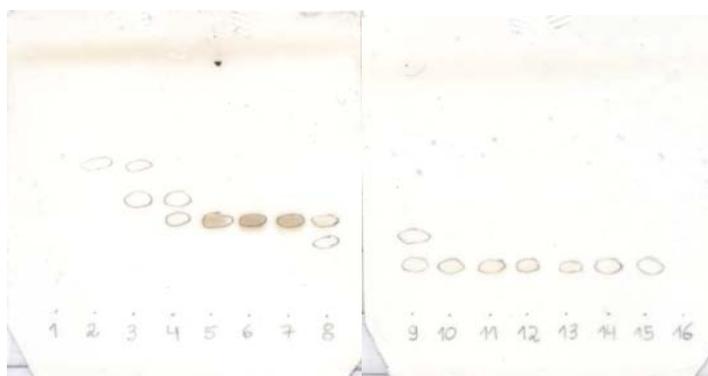
3.2 OBTENÇÃO DO ESTEVIOLBIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO B

Com a aplicação da metodologia descrita no item 2.4 obtivemos os seguintes resultados:

Figura 9 - Cromatoplasmas de separação de esteviolbiosídeo (I)



Pôde-se observar nestas cromatoplasmas os tubos (frações) com residuais da hidrólise alcalina (tubos 1 a 3), frações contendo esteviolbiosídeo (tubos 5 e 6) e frações contendo rebaudiosídeo B (tubos 9 a 15).

Figura 10 - Cromatoplasmas de separação de esteviolbiosídeo (II)

Acreditou-se que os tubos 1 a 4 ainda apresentem alguma contaminação residual da hidrólise alcalina. Os tubos 5 a 7 seriam as frações purificadas de esteviolbiosídeo. Os tubos 8 e 9 frações de transição e os tubos 10 a 15 frações purificadas de rebaudiosídeo B. A ordem entre o esteviolbiosídeo e o rebaudiosídeo B são explicadas pelas suas ordens de polaridade e afinidade com a placa de sílica gel.

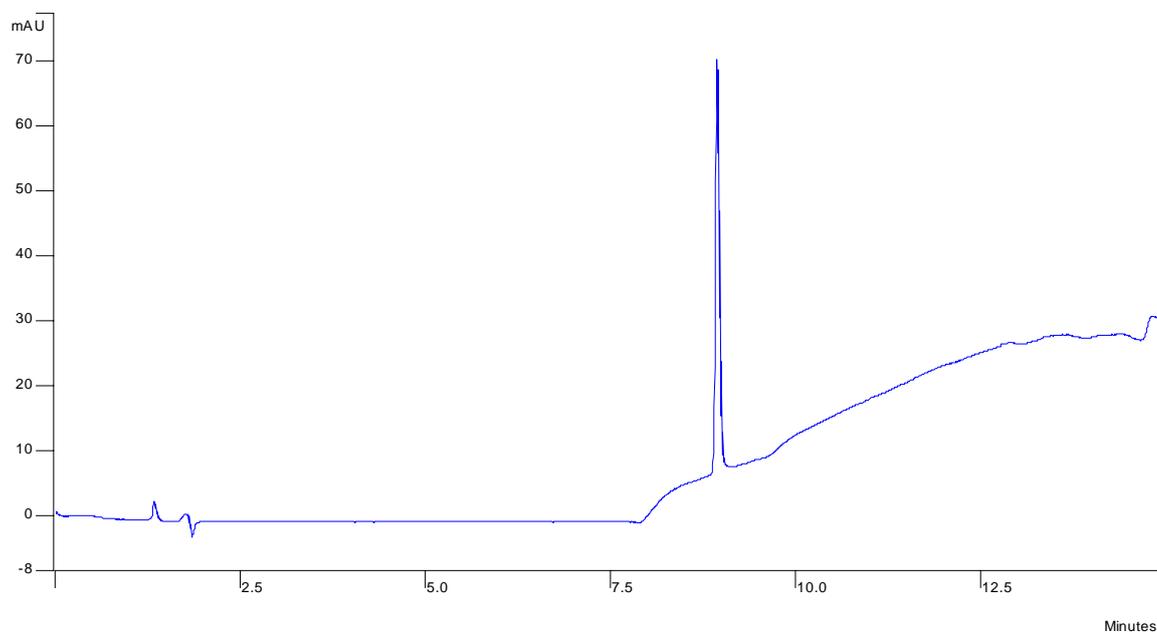
Figura 11 - Cromatoplasmas de separação de esteviolbiosídeo (III)

Esta separação foi realizada após recrystalização do esteviolbiosídeo. O resultado obtido demonstra a retirada dos residuais da hidrólise alcalina e aumenta o rendimento da separação. Tem-se os tubos 1 a 4 com frações de esteviolbiosídeo, o tubo 5 de transição e os tubos 6 a 11 com frações de rebaudiosídeo B.

Para continuar o isolamento de esteviolbiosídeo e rebaudiosídeo B o procedimento utilizado foi o mesmo apresentado neste último CCD, ou seja, antes de proceder à separação por Chromatotron[®] foi realizada a recrystalização do material.

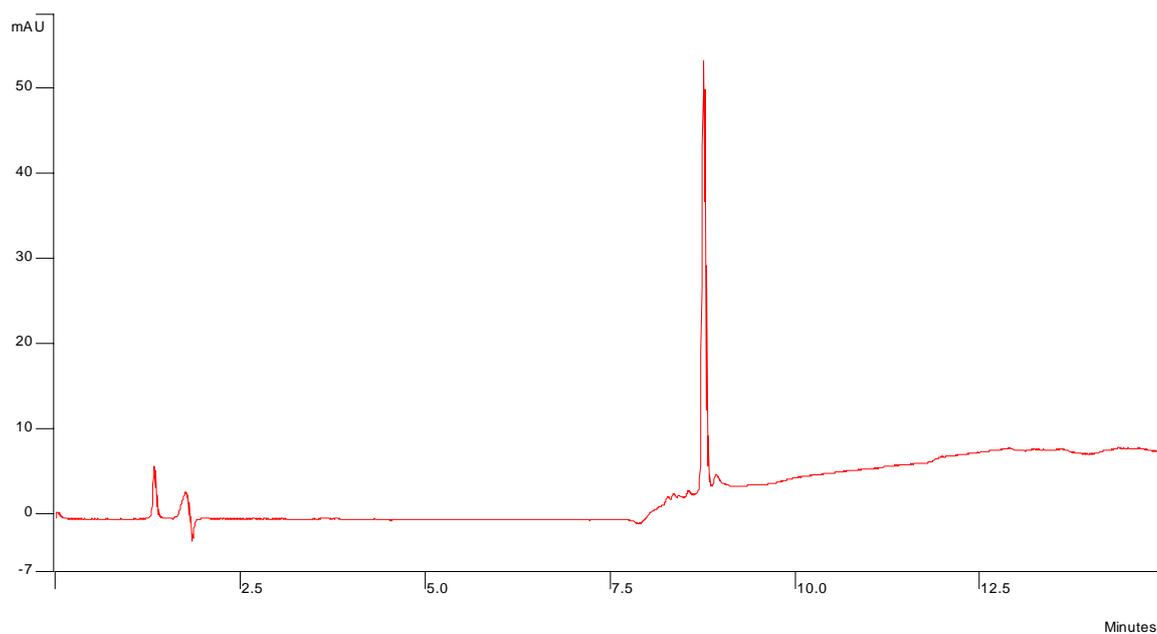
Este material purificado foi examinado por CLAE de acordo com metodologia anteriormente descrita e os cromatogramas estão dispostos a seguir:

Figura 12 - Cromatograma por CLAE do esteviolbiosídeo



Nota: Condições de análise: Tabela 6

Figura 13 - Cromatograma por CLAE do rebaudiosídeo B



Nota: Condições de análise: Tabela 6

Após comprovação de pureza pelo CLAE as amostras em questão foram analisadas em Espectrômetro de Massas e foram obtidos os seguintes resultados:

Na Figura 43 pôde-se observar o sinal correspondente ao esteviolbiosídeo (641,1 uma) ionizado em modo negativo [M-H].

Na Figura 44 pode-se observar o sinal correspondente esteviolbiosídeo (641,3 uma) (MS2). Os fragmentos a serem analisados são: 479,3 uma e 317,5 uma, e são indicativos da perda das duas moléculas de glicose em configuração β com retenção de oxigênio pela molécula a ser fragmentada. O último fragmento (317,5 uma) corresponde à estrutura do esteviol altamente estável. As condições ofertadas foram as estabelecidas na metodologia com exceção do gás de colisão: 6 psi, e da energia de colisão: -60 volts.

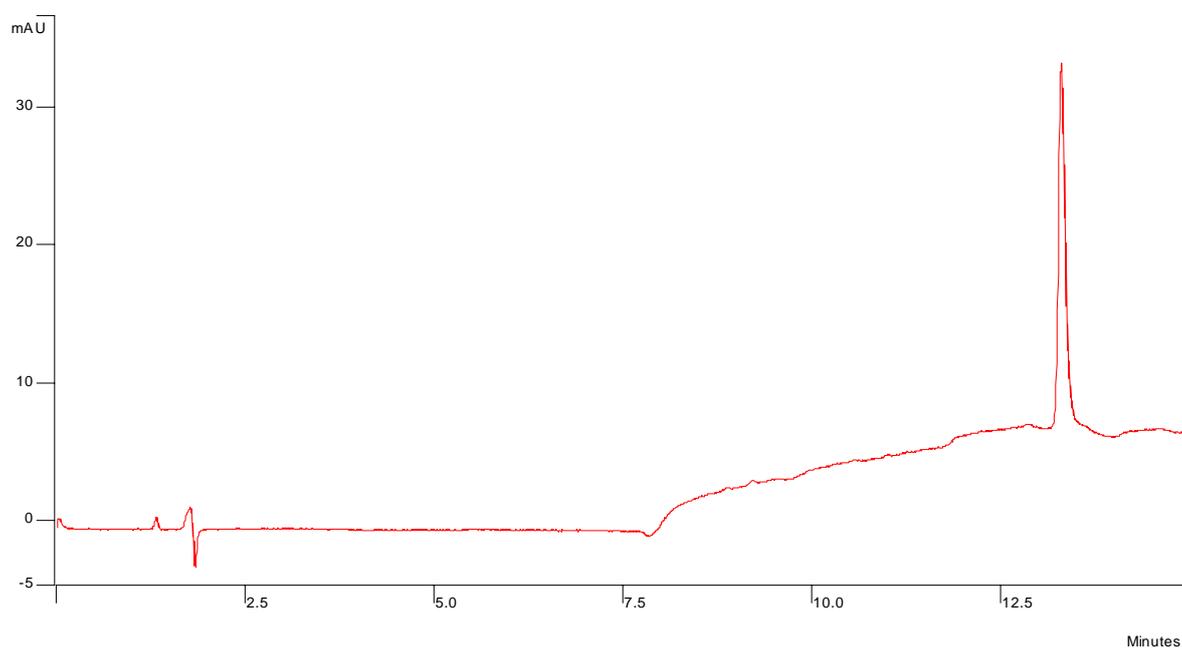
Na Figura 48 pode-se observar o sinal correspondente ao rebaudiosídeo B (803,4 uma) ionizado em modo negativo [M-H].

Na Figura 49 pode-se observar o sinal correspondente ao rebaudiosídeo B (803,4 uma) (MS2). Os fragmentos a serem analisados são: 641,1 uma; 479,4 uma e 317,1 uma e são indicativos da perda das três moléculas de glicose em configuração β com retenção de oxigênio pela molécula a ser fragmentada. O último fragmento (317,1 uma) corresponde à estrutura do esteviol altamente estável. As condições de análise constam na metodologia com exceção do gás de colisão: 6 psi.

3.3 OBTENÇÃO DO ESTEVIOL

O esteviol obtido (ver método 2.5) por hidrólise ácida foi purificado fazendo uso da técnica aliada ao Chromatotron[®] com as mesmas condições utilizadas anteriormente. Após purificação visualizada por CCD fez-se uso de CLAE para comprovação de pureza (Fig.13). A amostra em questão foi analisada em Espectrômetro de Massas de acordo com método 2.2.2 e foram obtidos os seguintes resultados.

Na Figura 50 pôde-se observar o sinal correspondente ao esteviol (317,3 uma) ionizado em modo negativo [M-H]. O sinal em 373,2 uma representa um aduto de acetato [M+CH₃COO].

Figura 14 - Cromatograma por CLAE do Esteviol

Nota: Condições de análise: Tabela 6

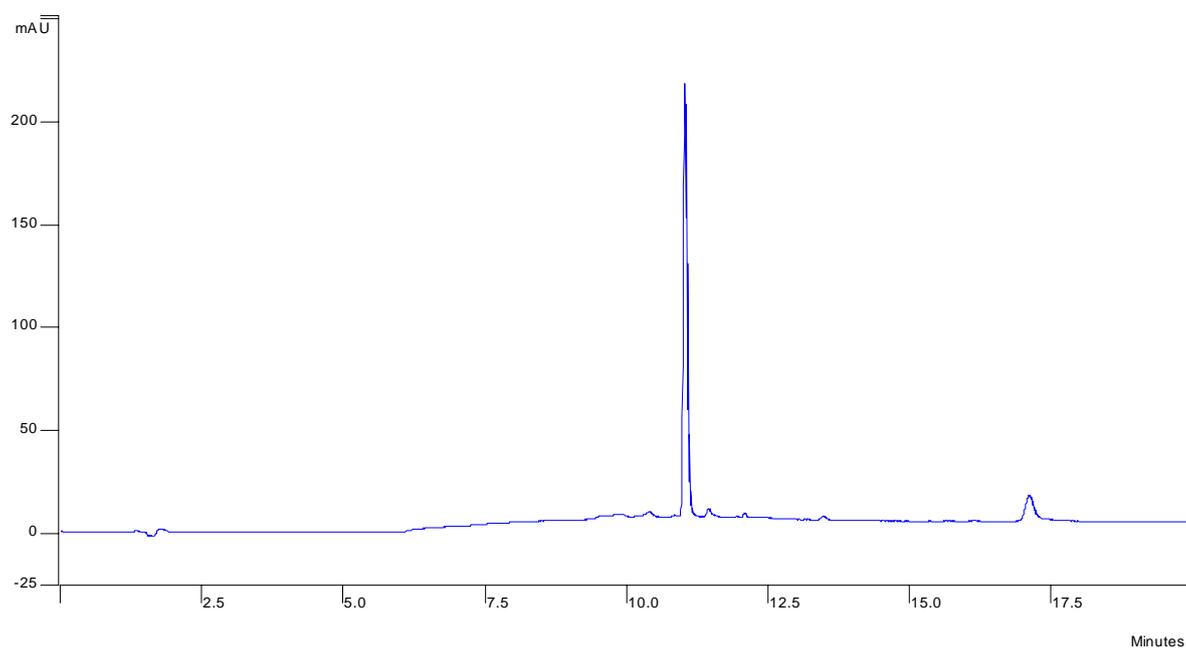
Na Figura 51 podemos observar o sinal correspondente ao esteviol (317,6 uma) (MS2) e fragmentos a serem analisados: 259,0 uma e 245,5 uma e são indicativos da perda dos radicais dos carbonos 4 e 16. As condições de análise constam na metodologia com exceção do gás de colisão: 6 psi, e da energia de colisão: -60 volts.

3.4 OBTENÇÃO DO ISOESTEVIOL

O isoesteviol obtido fazendo uso da metodologia 2.6 foi purificado e analisado por CLAE (Fig.15).

Foi utilizado o espectrômetro de massas para confirmação de peso molecular do composto. O espectro pode ser visto no modo negativo $[M-H]^-$ (MS1) no anexo deste trabalho (Fig.55), com sinal correspondente ao isoesteviol em 317,3 uma.

Figura 15 - Cromatograma por CLAE do isoesteviol



Nota: Condições de análise: Tabela 6

3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Com a finalidade de pesquisar possíveis compostos hemolíticos entre os anteriormente purificados foi realizada a atividade hemolítica de cada um deles. A origem do interesse para esta pesquisa foi baseada nas atividades biológicas do esteviol e suas características físicas.

Os resultados foram ausência de atividade em todos os compostos analisados (esteviosídeo, rebaudiosídeo A e B, esteviolbiosídeo, esteviol e isoesteviol) e confirmação de atividade hemolítica no controle positivo.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *GIBBERELLA FUJIKUROI*

A primeira etapa, quando tratamos do fungo filamentoso *G. fujikuroi*, foi a purificação da cepa. A cepa que nos foi entregue estava em cultura estoque e foi então

repicada para ágar em placa para visualização de uma possível contaminação. A contaminação foi comprovada logo nas primeiras 48 horas, tratava-se de *Aspergillus* sp. Nossa próxima ação foi na tentativa de isolamento da cepa de interesse.

A opção pelo uso da glicose no lugar da sacarose na composição do meio de cultura (ágar) deve-se ao fato de facilitar a utilização da fonte de carboidrato por parte da cepa injuriada. Diminuindo a fase *lag* (fase de adaptação) e recuperando a injúria com maior rapidez. Temos a consciência que alterando esta fonte de carbono estamos diminuindo o tempo de incubação, pois certamente a fonte de carboidrato glicose será esgotada mais rapidamente pelo sistema enzimático do fungo que a fonte de carboidrato: sacarose.

Os resultados já foram bastante satisfatórios na primeira seleção, mesmo assim repetimos novamente a metodologia para maior garantia da purificação da cepa de *G. fujikuroi* nos meios Ágar Sabouraud modificado e YPG 2 %. Os meios de cultura escolhidos foram estes, pois precisávamos de crescimento adequado para a expressão máxima dos microrganismos.

Figura 16 - Cultura de *G. fujikuroi* em Meio Ágar Sabouraud modificado (face superior), repique por isolamento

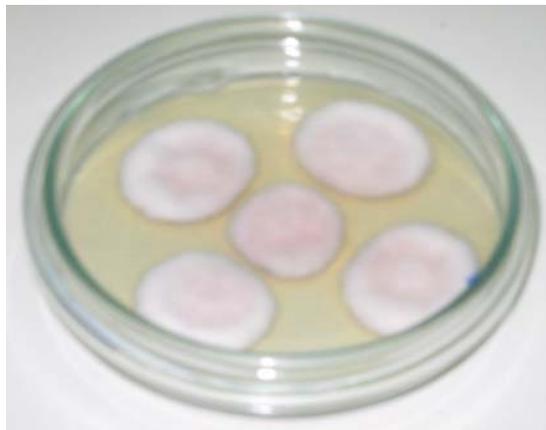
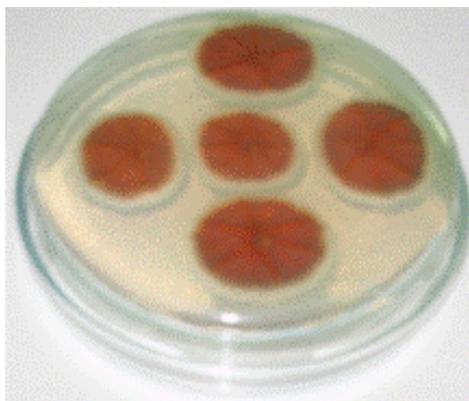


Figura 17 - Cultura de *G. fujikuroi* em Meio Ágar Sabouraud modificado (face inferior), repique por isolamento



Nota: Verificação da coloração (carotenóides) característica da cepa de *G. fujikuroi*.

Figura 18 - Cultura de *G. fujikuroi* em Meio YPG 2 % (face superior), repique por isolamento

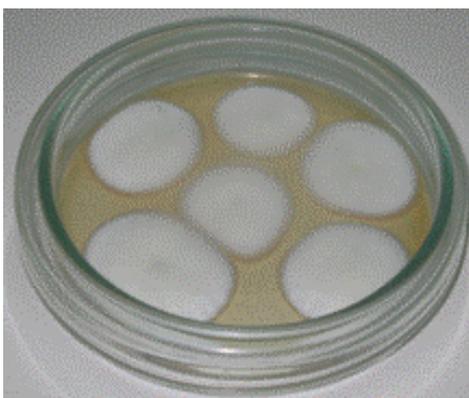
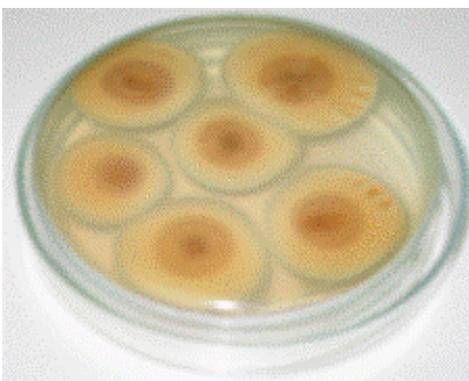
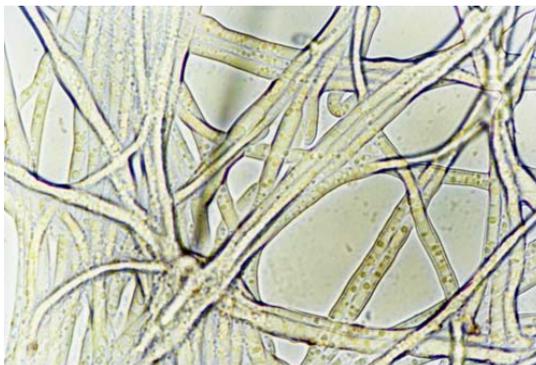


Figura 19 - Cultura de *G. fujikuroi* em Meio YPG 2 % (face inferior), repique por isolamento



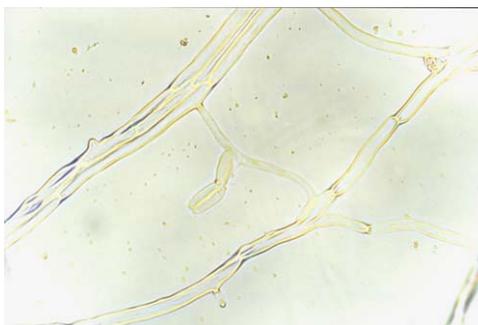
Foram realizadas fotomicrografias da cepa de *G. fujikuroi* para comprovar sua natureza e identidade.

Figura 20 - Fotomicrografia do fungo filamentosso *G. fujikuroi*



Nota: Verificação da estrutura filamentososa do fungo.

Figura 21 - Fotomicrografia do fungo filamentosso *G. fujikuroi*



Nota: Verificação da coloração de parede e crescimento do fungo.

Realizado o isolamento da cepa de *G. fujikuroi* foi preciso ativá-la e restabelecer todo seu sistema enzimático. Para isto foi utilizado Ágar Sabouraud modificado com glicose em tubos inclinado. A finalidade de utilizar-se a glicose aqui é a mesma do isolamento da cepa, ou seja, facilidade em sua utilização.

Após verificação da presença de coloração característica de *G. fujikuroi*, foi dado início ao experimento de produção de giberelinas. Este ensaio foi realizado com o objetivo de caracterizar o fungo em questão e sua atividade de síntese de giberelinas, cuja rota coincide inicialmente com a rota de metabolização enzimática requerida. Analisamos o produto obtido por CCD, primeiramente, para visualização da presença de giberelinas

comparativamente ao padrão e após, por CLAE. Confirmamos a presença de giberelinas no produto de biotransformação do fungo.

Estes resultados confirmaram a identidade da cepa em questão.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A razão para realização do teste de atividade antimicrobiana foi verificação de possível atividade de alguns dos constituintes majoritários do adoçante comercial estarem interferindo nos resultados de biotransformação que estarão apresentados a seguir.

As cepas para esta análise foram escolhidas de acordo com seu perfil microbiológico, de forma que temos uma cepa representante de cocos gram positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - IAL 1606), duas representantes de bacilos gram negativos fermentadores (*Escherichia coli* ATCC 11229 - IAL 2074, *Salmonella choleraesuis* var. typhimurium ATCC 14028 - IAL 2364), uma representante de bacilos gram negativos não fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 - IAL 1853), um fungo leveduriforme (*Candida albicans* ATCC 10231 - IAL 2083) e um fungo filamentosos (*Gibberella fujikuroi* ATCC 12616). Outro critério que também foi utilizado para escolha destes microrganismos foi a legislação (Resolução - RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001) e critérios estabelecidos pela mesma. Estas cepas foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz (IAL) com exceção da cepa de *G. fujikuroi* que foi obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade.

Um dos passos mais importantes no processo da prova em questão, foi a preparação do inóculo por suspensão direta de colônias e fase logarítmica de crescimento. Somente o método de suspensão direta de colônias promoveu resultados precisos para certos microrganismos e por tal motivo este foi o método de escolha para realização da pesquisa. Em ambos os métodos, a turbidez da suspensão foi padronizada (para que seja igual) ao padrão 0,5 de McFarland (o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). As suspensões assim ajustadas foram utilizadas como inóculo dentro dos 15 minutos seguintes.

Tabela 7 - Qualificação da atividade antimicrobiana

Microrganismos	1		2		3		4		5		6	
	A1	A2										
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> var. typhimurium	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>G. fujikuroi</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Nota: (1) Esteviosídeo; (2) Esteviolbiosídeo; (3) Esteviol; (4) Rebaudiosídeo A; (5) Rebaudiosídeo B; (6) Isoesteviol; (A1) Análise; (A2) Replicata.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana: esteviol

Microrganismos	Esteviol		Média obtida
	A1	A2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1 mm	1 mm	1 mm
<i>Salmonella choleraesuis</i> var. typhimurium	1 mm	1 mm	1 mm
<i>Candida albicans</i>	4 mm	3 mm	3,5 mm
<i>G. fujikuroi</i>	5 mm	4 mm	4,5 mm

Nota: (A1) Amostra; (A2) Replicata.

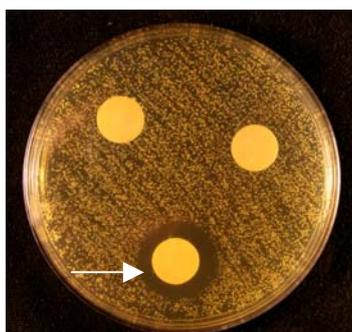
Figura 22 - Atividade antimicrobiana do esteviol frente à *Candida albicans*

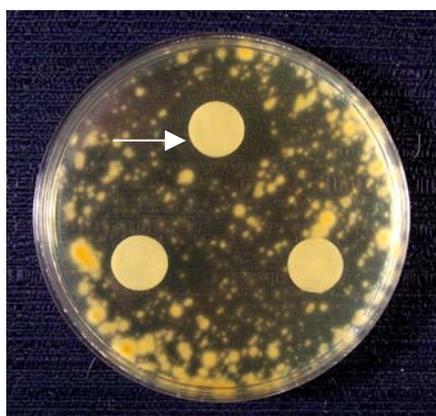
Figura 23 - Atividade antimicrobiana do esteviol frente à *Gibberella fujikuroi*

Tabela 9 - Atividade antimicrobiana: rebaudiosídeo A

Microorganismos	Rebaudiosídeo		Média obtida
	A1	A2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1 mm	0,8 mm	0,90 mm
<i>Salmonella choleraesuis</i> var. typhimurium	1 mm	0,9 mm	0,95 mm
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>G. fujikuroi</i>	-	-	-

Dos compostos diterpênicos analisados somente o esteviol e o rebaudiosídeo A demonstraram atividade antibacteriana frente aos microrganismos testados.

Mas o que nos chamou a atenção foi o efeito antibacteriano que o esteviol produziu frente à cepa de *G. fujikuroi*. Por este motivo foi dado prosseguimento às experiências com o extrato enzimático do fungo, para que este efeito seja reduzido.

3.8 MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ESTEVIOSÍDEO

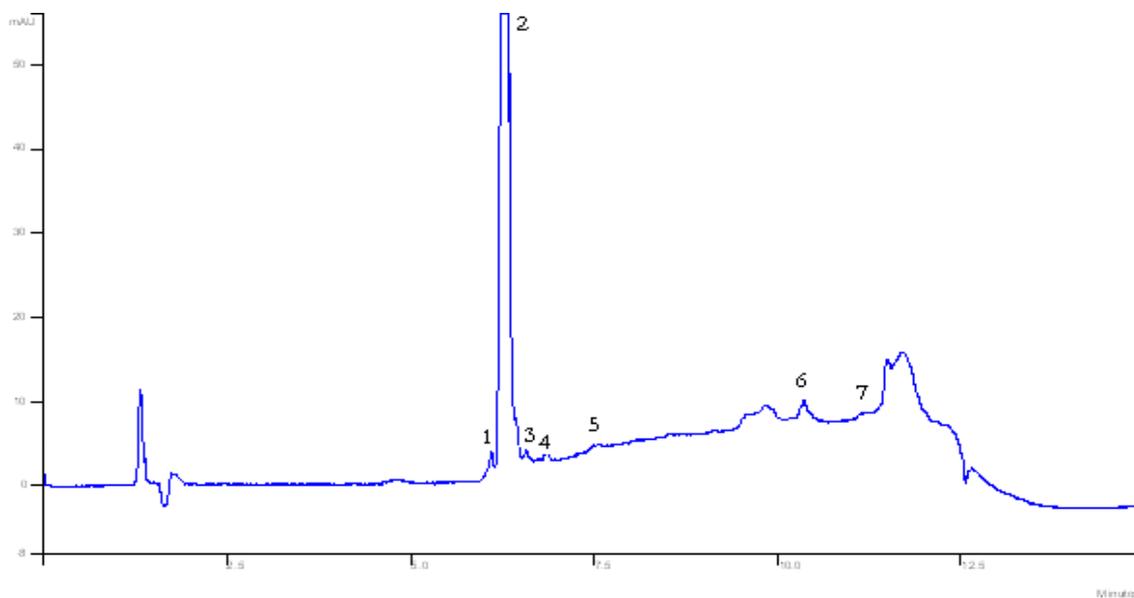
A modificação enzimática do esteviosídeo puro, e do produto comercial, foram realizadas de acordo com método 2.11. Os cromatogramas a seguir são referentes ao produto do metabolismo das enzimas (extrato enzimático) da *G. fujikuroi* quando da

utilização do substrato purificado esteviosídeo (Fig.6) como fonte única de carboidrato nos tempos de 5 (Fig.24), 7 (Fig.25) e 15 (Fig.26) dias. As condições de análise podem ser observadas na Tabela 5.

Quando foi comparado este cromatograma (metabolização enzimática do esteviosídeo purificado) com os cromatogramas obtidos dos glicosídeos isolados (esteviosídeo, rebaudiosídeos A e B, esteviol, isoesteviol e esteviolbiosídeo) e do esteviolmonosídeo (identificado em espectrômetro de massas a partir do extrato, ver item 3.11), obteve-se a identificação dos picos correspondentes aos compostos majoritários (interesse deste trabalho) nestes cromatogramas.

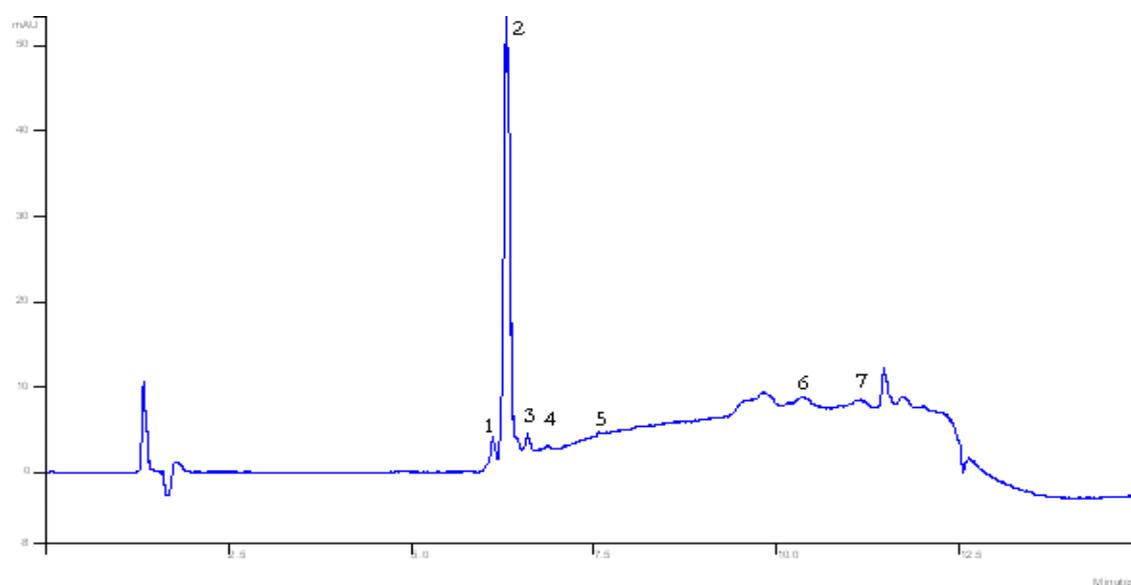
Pode ser evidenciado nestes cromatogramas o consumo do esteviosídeo pela *G. fujikuroi* e a transformação deste em produtos de grande interesse como o rebaudiosídeo A, aumentando a qualidade do produto final em dulçor e estabilidade como discutido anteriormente na introdução do trabalho.

Figura 24 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com esteviosídeo purificado: 5 dias



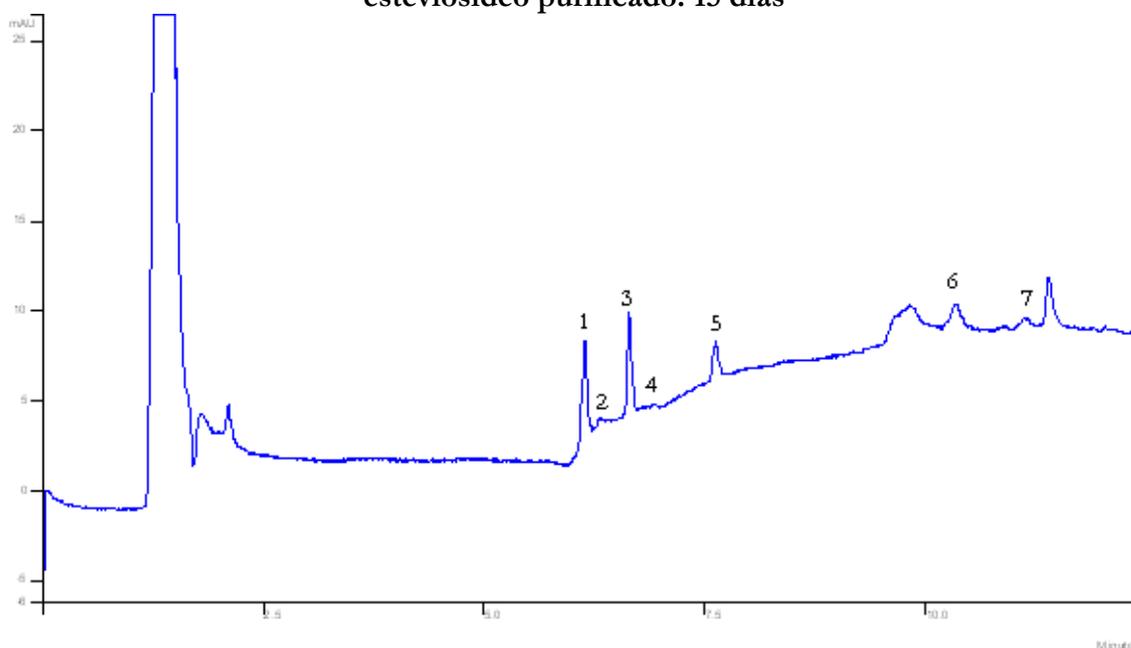
Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 25 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com esteviosídeo purificado: 7 dias

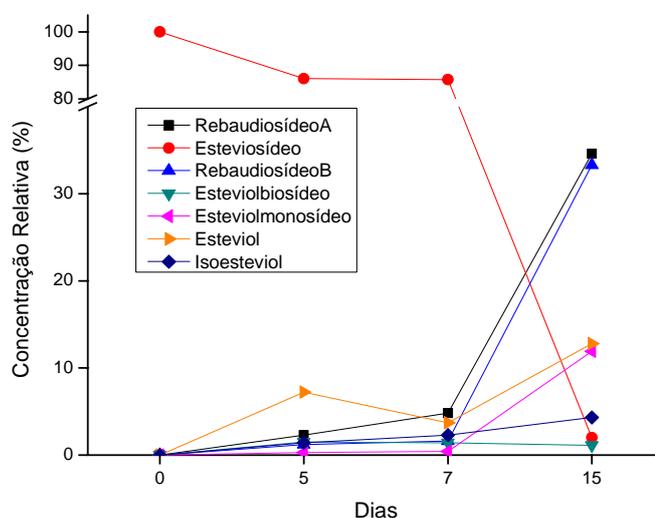


Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 26 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com esteviosídeo purificado: 15 dias



Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Gráfico 1 - Cinética da modificação enzimática do esteviosídeo puro.

Observando o Gráfico 1, tempo de 0 a 5 dias, pode-se evidenciar o consumo de esteviosídeo e a formação de esteviol (principalmente), sugerindo portanto a atividade de enzimas hidrolíticas. A partir deste ponto (tempo 5 dias) pode-se observar a formação de compostos como o rebaudiosídeo A e B, principalmente após o tempo de 7 dias. O produto assim formado no 15º dia tem uma alta proporção de rebaudiosídeo A em comparação com o esteviosídeo. O que nos sugere a melhora nas características organolépticas e físicas deste produto. Somente testes de análise sensorial poderiam confirmar esta hipótese, pois além do rebaudiosídeo A pode-se observar a formação de compostos de paladar inferior.

3.9 MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO PRODUTO COMERCIAL

Como a purificação do esteviosídeo se torna onerosa para implementação industrial, a partir deste ponto foi iniciado o trabalho com a modificação do produto comercial (Stevita Cristal®).

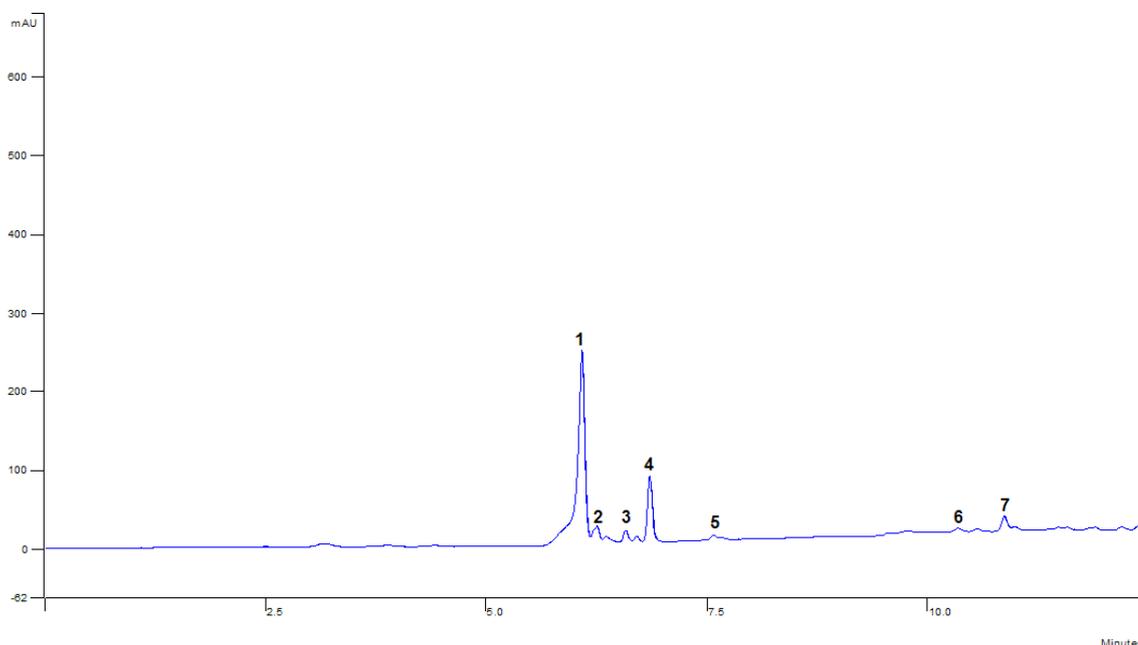
Seguindo metodologia anteriormente descrita os resultados estão dispostos a seguir. Vale lembrar que foram utilizados para esta biotransformação os dois produtos comerciais com a finalidade de comparação, o produto antigo obtido por extração com solvente (ES) e o produto novo em que se faz uso de resinas de adsorção (RA).

O primeiro aspecto que aqui vale salientar é a solubilidade destes dois produtos: o produto anteriormente comercializado teve solubilidade dificultada a frio e necessitou de um volume maior de água para solubilizar-se quando comparado com o produto atualmente comercializado que solubilizou-se facilmente a frio.

Outro aspecto que merece destaque é sua estabilidade quando da autoclavação para esterilização do meio de cultura para biotransformação: o produto anteriormente comercializado com simples autoclavação sofreu hidrólise e por tal motivo cuidados adicionais foram dispensados ao contrário do produto atualmente comercializado que não foi hidrolizado por autoclavação simples quando analisados os produtos de interesse.

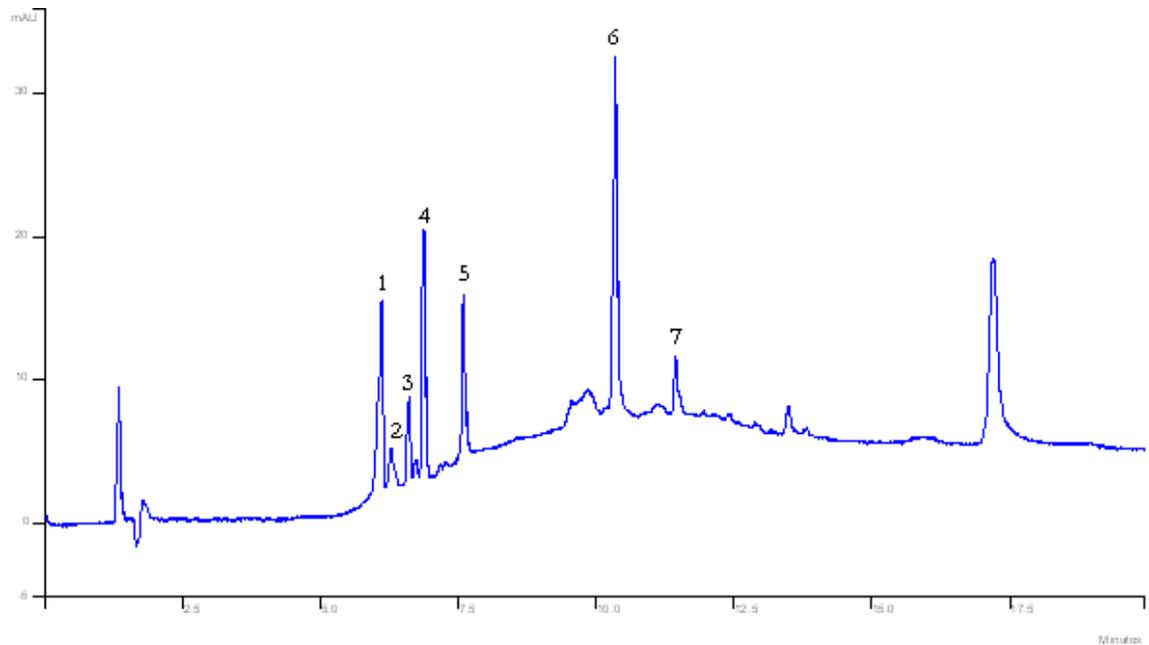
Os produtos da biotransformação coletados nos tempos 5, 10 e 15 dias bem como o produto comercial em questão (tempo 0) foram analisados por CLAE (Tab.5) de acordo com metodologia anteriormente citada e também pelo Espectrômetro de massas cujo resultado está disposto em anexo (Fig.59). Vale ressaltar que para esta e as biotransformações seguintes foi utilizado meio de cultivo livre de células do fungo *G. fujikuroi*.

Figura 27 - Cromatograma por CLAE do produto Stevita Cristal® (ES)



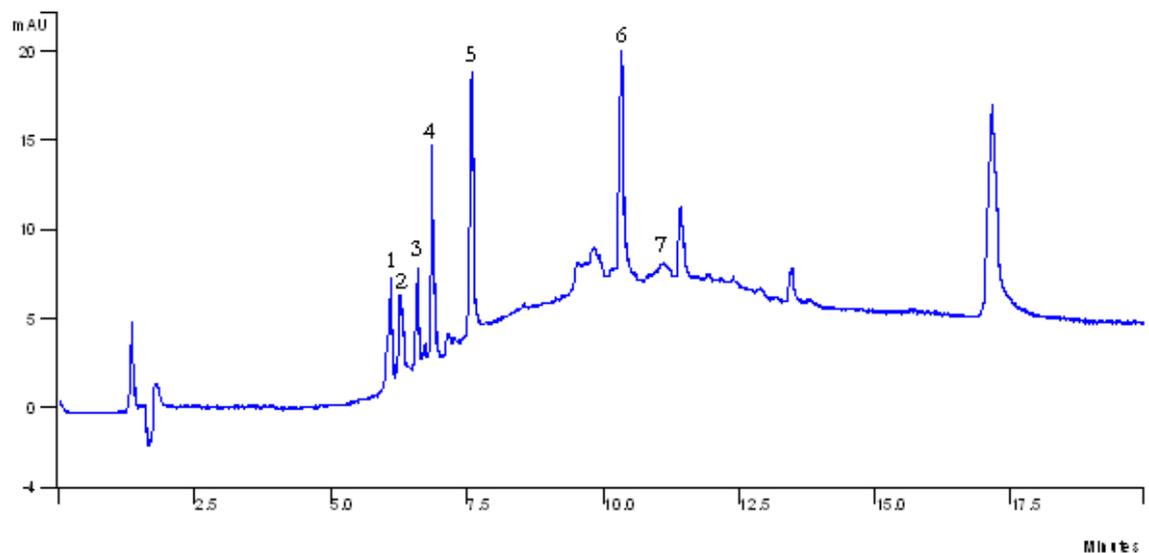
Nota: (1) Esteviosídeo; (2) Rebaudiosídeo A; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 28 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (ES): 5 dias



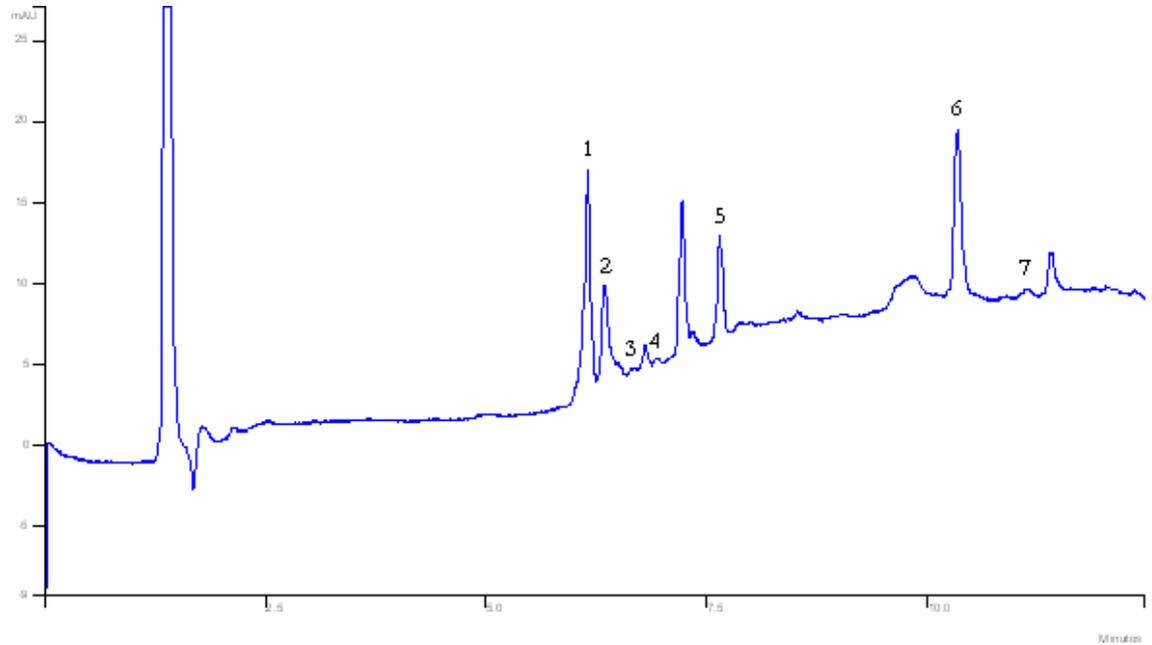
Nota: (1) Esteviosídeo; (2) Rebaudiosídeo A; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 29 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (ES): 7 dias



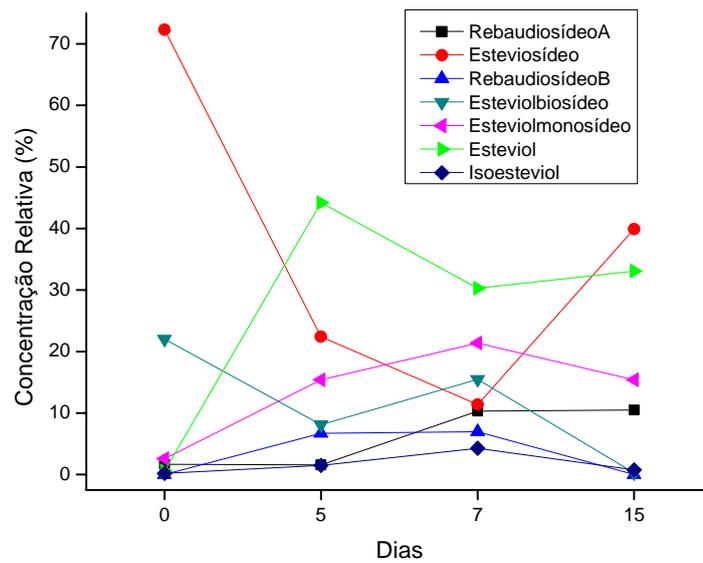
Nota: (1) Esteviosídeo; (2) Rebaudiosídeo A; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 30 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (ES): 15 dias



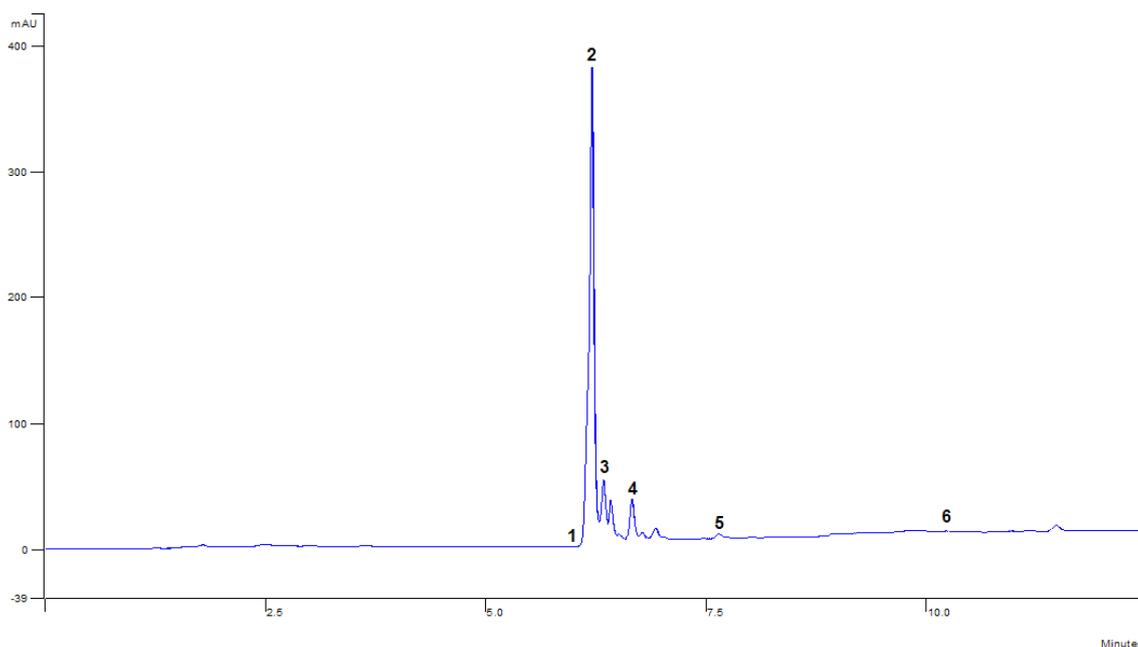
Nota: (1) Esteviosídeo; (2) Rebaudiosídeo A; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Gráfico 2 - Cinética da modificação enzimática da Stevita Cristal® (ES)



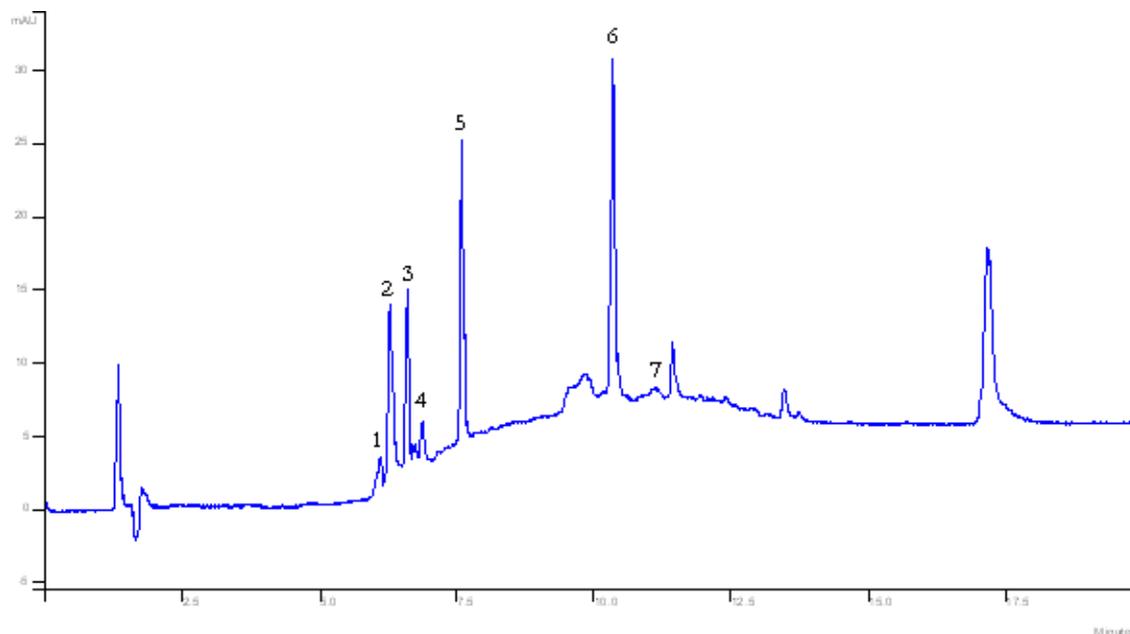
O que se pode observar nesta biotransformação do produto comercial extraído com solventes é a utilização do esteviosídeo (principalmente), por ser rico em moléculas de glicose necessárias para o processo de biossíntese dos demais compostos e a transformação em compostos de menor energia (número de moléculas de glicose) nos primeiros dias (esteviol e esteviolmonosídeo). A partir do 5º dia existe a retomada da rota de biossíntese para produção de rebaudiosídeo A (com melhores características organolépticas). Observando os resultados desta biotransformação sugere-se a presença de enzimas que retiram e colocam glicoses (β -glicoses), talvez até a mesma enzima que trabalhe nas duas situações dependentes do substrato fornecido. O experimento não teve continuidade depois do 15º dia, pois não foi possível manter o meio de cultura sem contaminação cruzada no agitador orbital termostaticado.

Figura 31 – Cromatograma por CLAE do produto Stevita Cristal® (RA)



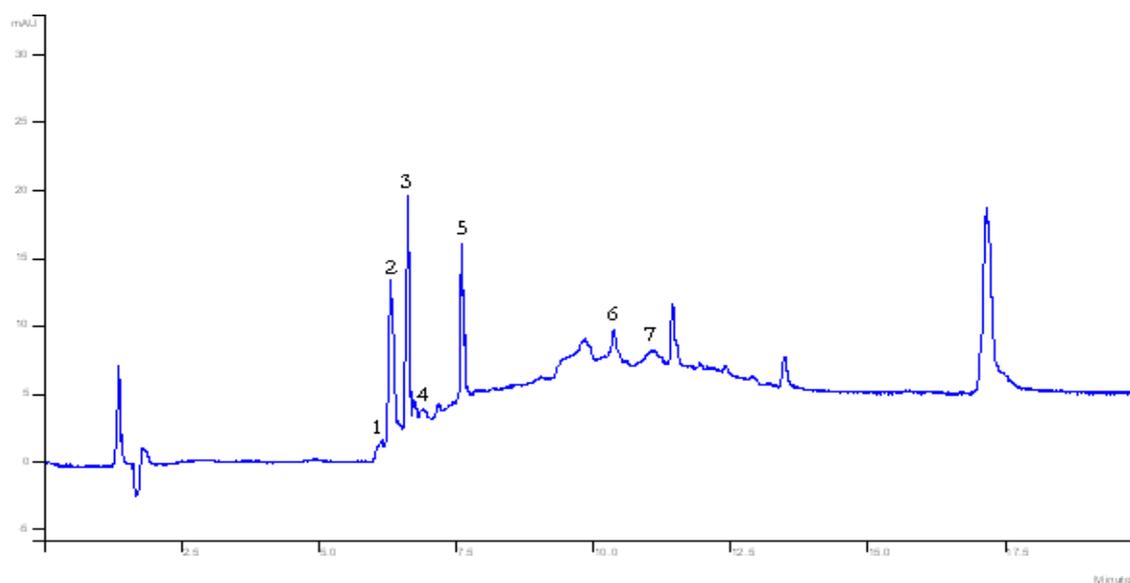
Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol.

Figura 32 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (RA): 5 dias



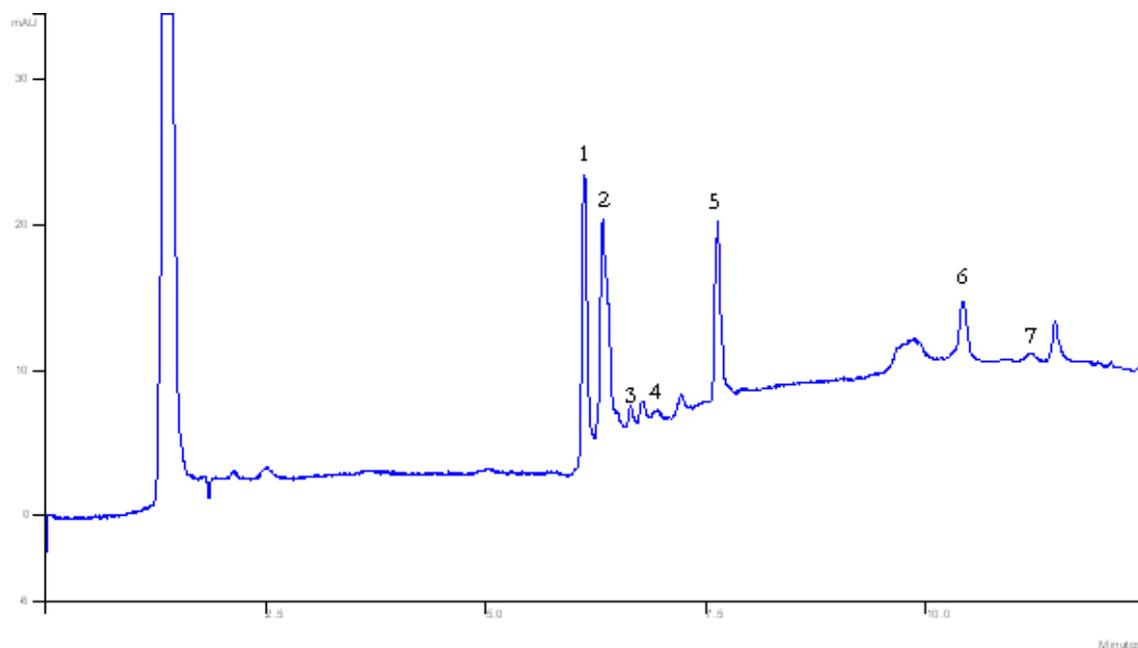
Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 33 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (RA): 7 dias



Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Figura 34 - Cromatograma por CLAE do produto da modificação enzimática com Stevita Cristal® (RA): 15 dias

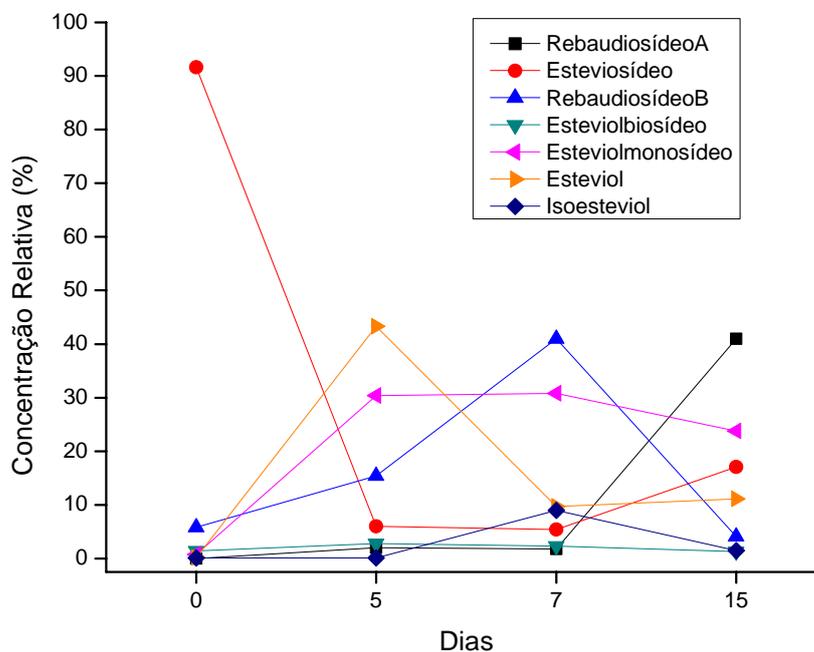


Nota: (1) Rebaudiosídeo A; (2) Esteviosídeo; (3) Rebaudiosídeo B; (4) Esteviolbiosídeo; (5) Esteviolmonosídeo; (6) Esteviol; (7) Isoesteviol.

Utilizando como substrato para biotransformação a Stevita Cristal® obtida com resinas de adsorção, o resultado foi um pouco diferenciado do anterior (processo de extração com solvente). Primeiramente (tempo 0 a 5 dias) foi observado um consumo exacerbado de esteviosídeo pelo complexo enzimático e formação de esteviol, rebaudiosídeo B e esteviolmonosídeo. O esteviol formado pode ser justificado pelo consumo de esteviosídeo, ou seja, das glicoses do esteviosídeo. O rebaudiosídeo B formado pode ser produto de reposicionamento de glicoses do esteviosídeo e o esteviolmonosídeo produto de formação a partir do esteviol ou então produto advindo do consumo do esteviosídeo.

Analisando os compostos nos tempos 5 e 7 dias foi observada uma produção mais acentuada de rebaudiosídeo B e um decréscimo de esteviol. O produto formado no tempo 7 dias apesar de ter, proporcionalmente, menos esteviol teria uma alta concentração de rebaudiosídeo B o que nos remeteria a uma próxima fase de glicosilação, a formação de rebaudiosídeo A (interesse do trabalho).

Gráfico 3 - Cinética da modificação enzimática da Stevita Cristal® (RA)

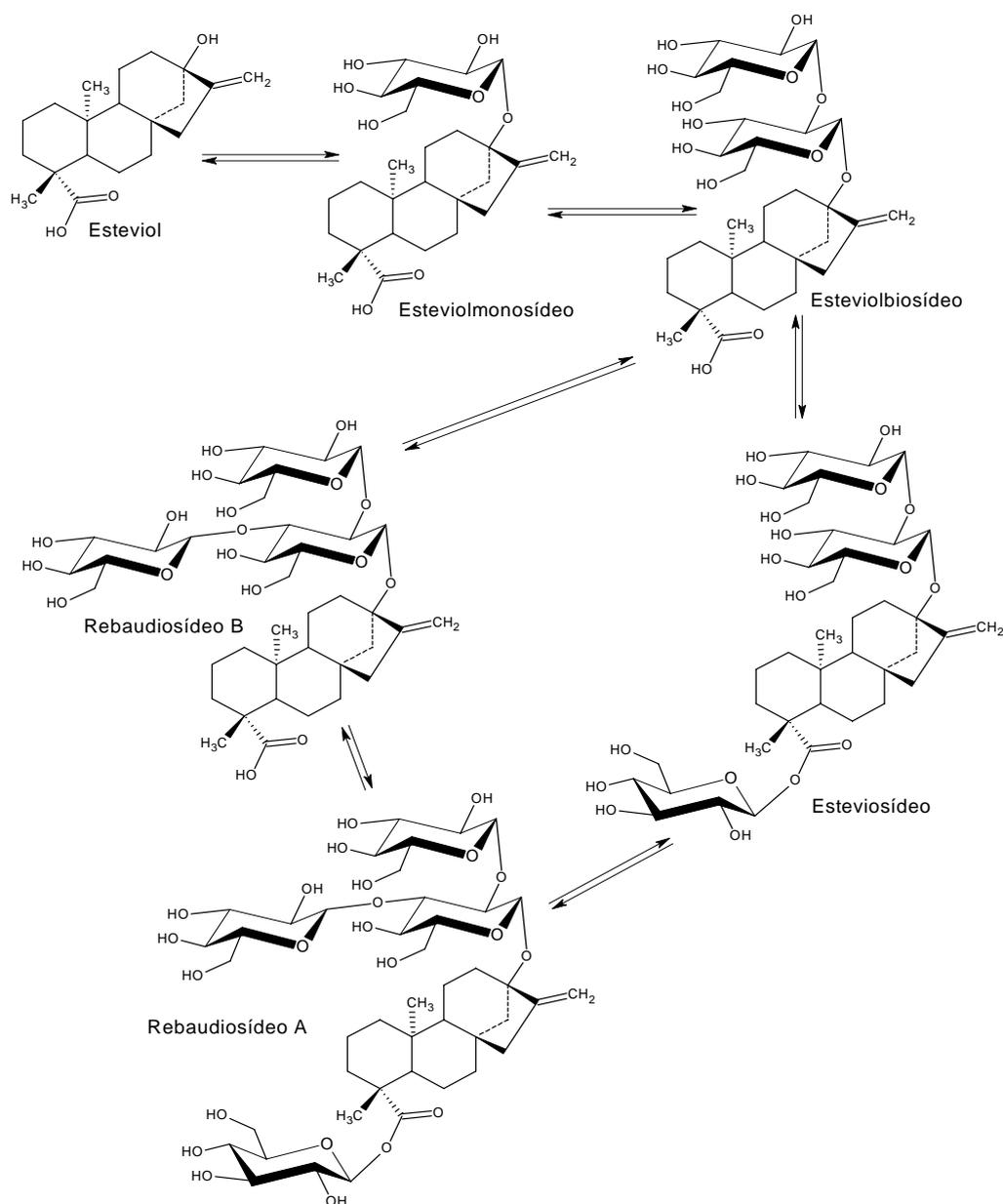


No tempo 7 a 15 dias foi observado o consumo de rebaudiosídeo B para formação de rebaudiosídeo A, sendo isto de interesse no trabalho por suas propriedades organolépticas que seriam acrescentadas ao produto final.

Portanto, o consumo de esteviosídeo promoveu a liberação de moléculas de glicose para então num segundo passo reposicioná-las no esqueleto *ent*-kaurenóico formando compostos de grande interesse. Isto pode ser observado pelo aumento de rebaudiosídeo A e esteviosídeo num terceiro momento (7 a 15 dias). Novamente pode-se observar que neste complexo enzimático foi trabalhado com enzimas diferentes: um grupo que retira e outro que adiciona moléculas de glicose e/ou foi trabalhado com enzimas que reposicionam estas moléculas trabalhando nos dois sentidos.

A rota de interconversões seguinte (Fig.35) é sugerida sob ponto de vista estrutural e analisando os resultados podemos somente ter certeza do início (esteviol) e final (rebaudiosídeo A) de rota. Os compostos intermediários são posicionados na rota pelo observado no experimento, alterando sutilmente o proposto por TOTTÉ et al, 2000.

Figura 35 - Possível rota de interconversões dos glicosídeos do esteviol



Na fig. 58 podemos observar os produtos do metabolismo do fungo filamentosso *G. fujikuroi* com pesos moleculares conhecidos de 317,2 uma (Esteviol), 641,6 uma (Esteviolbiosídeo), 803,5 uma (Esteviosídeo e Rebaudiosídeo B), e 965,4 uma (Rebaudiosídeo A) ionizados em modo negativo $[M-H]^-$. Os pesos moleculares 373,5 uma, 704,2 uma e 863,6 uma representam adutos de acetato.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DO ESTEVIOSÍDEO E DO REBAUDIOSÍDEO A POR MRM

O que pôde ser observado pelo CLAE quando estes dois compostos são analisados em conjunto são seus tempos de retenção muito próximos o que resultou em incertezas quanto à seqüência na identificação em comparação com seus padrões isolados e áreas obtidas pelos mesmos. Para solucionar este problema a co-eluição não foi suficiente e foi então realizada a instauração do método em MRM (Múltipla reação Monitorada), para subsequente análise.

Os resultados obtidos com a utilização deste método podem ser visualizados através dos espectros em anexo (Fig. 60 e 61).

A Figura 60 mostra o resultado obtido quando são solubilizadas alíquotas em igual proporção de esteviosídeo e rebaudiosídeo A isolados do adoçante comercial como descrito anteriormente. O que se pode observar é a separação dos picos. Em vermelho está o Rebaudiosídeo A e em azul está indicado o esteviosídeo ambos identificados anteriormente por espectrometria de massas modo negativo em MS1 e MS2.

A Figura 61 mostra o resultado obtido quando analisado o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A do biotransformado pela *G. fujikuroi* (extrato enzimático). A identificação dos picos foi obtida da mesma forma da situação anterior, mas aqui foi observada difusão dos picos o que nos permite pensar em aumento de afinidade química entre os dois compostos quando a rota biossintética é estabelecida.

3.11 CARACTERIZAÇÃO DO ESTEVIOLMONOSÍDEO

O esteviolmonosídeo foi caracterizado a partir do biotransformado da Stevita Cristal® (RA) no tempo 15 dias. Foi escolhida esta amostra, pois esta apresentou três compostos majoritários, sendo dois conhecidos e um desconhecido de interesse, a saber.

Os resultados obtidos podem ser observados em MS1, modo positivo (Fig.62; sinal de interesse: 498,5 uma) e negativo (Fig.63; sinal de interesse: 479,4 uma), identificando os sinais dos três compostos majoritários, e em MS2 (Fig.64) identificando o íon molecular 479,2 uma e fragmento 317,4 uma (modo negativo), indicando a presença de uma glicose na estrutura.

4 CONCLUSÕES

Comparando os produtos comerciais com os produtos obtidos após a biotransformação, podemos concluir que o produto biotransformado tem melhores características organolépticas, pois a proporção rebaudiosídeo A:esteviosídeo foi elevada num tempo de 15 dias.

Podemos concluir que teoricamente este produto possui melhor característica física, maior estabilidade, quando analisamos a solubilidade do produto, pois proporções elevadas de rebaudiosídeo A melhoram sensivelmente a solubilização do produto ao contrário do esteviosídeo que facilita a cristalização e desenvolve também amargor residual quando da sua utilização como discutido anteriormente.

Também vale lembrar que o esteviol produz comprovadamente efeitos indesejáveis quando da sua utilização em longos períodos e neste sentido podemos analisar como fator importante o aumento nas proporções dos glicosídeos complexos do esteviol, pois estes precisarão de maior tempo de contato na mucosa intestinal para serem convertidos pela microflora humana à esteviol e com isso dependendo da velocidade do trânsito gastrointestinal teríamos redução na absorção deste composto.

Em resumo, conseguimos produzir com auxílio do sistema enzimático do fungo filamentoso *G. fujikuroi* um produto, teoricamente, mais seguro e de melhor qualidade em edulcorantes provenientes da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVALOS, J., CERDÁ-OLMEDO, E. Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*. **PHYTOCHEM.**, 25, p. 1837-1841, 1986.

AVALOS, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; PRADO, M.; CERDÁ-OLMEDO, E. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella*. **J. BOT. GALL.**, 146, p. 55-65, 1999.

BARRERO, A.; SÁNCHEZ, J.; OLTRA, J.; TAMAYO, N.; CERDÁ-OLMEDO, E.; CANDAU, R.; AVALOS, J. Fusarin C and 8Z-Fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. **PHYTOCHEM.**, 30, p. 2259-2263, 1991.

BORROW, A.; JEFFERYS, E. G.; NIXON, I. S. Process for the production of Gibberellic acid. Patent specification, Int. C12d BRITISH no 838,033, 29 jan. 1958, 22 jun 1960, 1955.

BRITTON, G; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids. **BIRKHÄUSER VERLAG**, Basel, 1998.

CARDOSO, J.M.P.; BATTOCHIO, J.R.; CARDELLO, H.M.A.B. Equivalência de Dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel. **CI. TECNOL. ALIMENT.**, v.24, n.3, p.448-452, 2004.

CHIMELLI, M. Obtenção de Giberelinas por Biotransformação fúngica do Esteviosídeo: Etapa de Deglicosilação. Curitiba, 2003. 146f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

CRAMMER, B.; IKAN, R. Progress in the chemistry and properties of the rebaudiosides. Em: **Developments in Sweeteners**. Grenby, T.H.; Elsevier Applied Science: London, p. 45-64, 1987.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

Dainippon Ink & Chem KK 1987 Patent JP62146599-A.

Disponível em: <<http://www.pinnaclenature.com/images/stevisleaf.jpg>> Acesso em: 11 nov. 2006.

Disponível em: <<http://www.bccm.belspo.be/news//11-02/images/Fus04.jpg>> Acesso em: 11 nov. 2006.

Disponível em: <<http://www.nics.naro.affrc.go.jp/hatasaku/mihonen/maps/CROP28.gif>> Acesso em: 11 nov. 2006.

DWIVEDI, R.S. Unnurtured and untaped super sweet nonsacchariferous plant species in Índia. **CURRENT ISSUE**, v.76, n.11, 1999.

ELKINS, R. S. **Nature's Sweetener**. Pleasant Grove, UT: Woodland Publishing, 1997.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Mato Grosso do Sul, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª.ed. **Estévia**, 2003

FUKUNAGA, Y.; MIYATA, T.; NAKAYASU, N.; MIZUTANI, K.; KASAI, R.; TANAKA, D. Enzymic transglucosylation products of stevioside: separation and sweetness evaluation. **AGRIC. BIOL. CHEM.**, v.53, n.6, p 1603-1607, 1989.

GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; CANZI, E.; ZANCHI, R.; PIETTA, P. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from *S. rebaudiana* Extracts by Human Microflora. **J. AGRIC. FOOD CHEM.**, v. 51, p. 6618-6622, 2003.

GEUNS, J.M.C. Safety of Stevia and stevioside. **RECENT RES. DEV. PHYTOCHEM.**, v.4, p.75-88, 2000.

GEUNS, J. M. C. Molecules of Interest: Stevioside. **PHYTOCHEM.**, 64, p. 913-921, 2003.

GEUNS, J.; BUYSE, J.; VANKEIRSBILCK, A.; TEMME, L. About the safety of stevioside used as a sweetener. **J. FOOD AGRIC. ENV.**, v. 2, p.290-291, 2004.

GIORDANO, W.; DOMENECH, C. Aeration affects acetate destination in *Gibberella fujikuroi*. **FEMS. MICROBIOL. LETT.**, 180, p. 111-116, 1999.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **CI. TECNOL. ALIMENT.**, v. 18, n.1, p.3-6, 1998.

HUTAPEA, A.; TOSKULKAO, C.; WILAIRAT, P.; BUDDHASUKH, D.; GLINSUKON, T. Digestion of Stevioside, a Natural Sweetener, by various digestive enzymes. **J. CLIN. BIOCHEM. NUTR.**, 23, p. 177-186, 1997.

HUXTABLE, R. Sweet and non-sweet constituents of *S. rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. 2002. In: KINGHORN, A. S., the Genus *S.*. **Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles**, v. 19. Taylor and Francis, London and NY, p. 160-177.

ISHI-IWAMOTO, E.; BRACHE, A. Stevioside is not metabolized in the isolated perfused rat liver. **RES. COMMUN. MOL. PATHOL. PHARMACOL.**, v. 87, p. 167-175, 1995.

KASAHARA, H.; HANADA, A.; KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the biosynthesis of Gibberellins in Arabidopsis. **THE J. BIOL. CHEM.**, v. 277, n.47, p.45188-45194, 2002.

KAWAIDE, H. Biochemical and Molecular Analyses of Gibberellin Biosynthesis in Fungi. **BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM.**, v. 70, n. 3, p. 583-590, 2006.

KINGHORN, A.D.; WU, C.D.; SOERTAJO, D.D. Stevioside. Em: **Alternative Sweeteners**, 3rd ed. O'Brien, Nabors; Dekker: New York, p. 167-183, 2001.

KITAHATA, S.; ISHIKAWA, H.; MIYATA, T.; TANAKA, O. Production of ruboside derivatives by transgalactosylation of various α -galactosidases. **AGRIC. BIOL. CHEM.**, v.53, n. 11, p 2923-2928, 1989.

KONISHIMA, T.; TAKASAKI, M. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. **PURE APPL. CHEM.**, v,74, p.1309-1316, 2002.

LALE, G.; JOGDAND, V.; GADRE, R. Morphological mutants of *Gibberella fujikuroi* for enhanced production of gibberellic acid. **J. APPL. MICROBIOL.**, 100, p. 65-72, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MACMILLAN, J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. **J. PLANT GROWTH REGUL.**, 20, p. 387-442, 2002.

MANUAL DE PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA/OMS. **Pruebas de Difusión por Disco.** Cap. 4. p.39-45.

MARCAVILLACA, M.; TORTORELLI, C. Panorama actual del cultivo y la producción de Kaá-Heé o Yerba dulce (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **ANAIS DE SAIPA**, v.9-10, n.36-45, p.245, 1992.

MELIS, M.S. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. **J. ETHNOPHARMACOLOGY**, v.167, p.157-161, 1999.

RICHMAN, A.S.; GIJZEN, M.; STARRATT, A.N.; YANG, Z.; BRANDLE, J.E. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. **PLANT J.**, v.19, n.4, p.411-421, 1999.

SANDMANN, G.; MISAWA, N. Fungal Carotenoids. In: OSIEWACZ, H. The mycota X. Industrial applications. **SPRINGER VERLAG**, Berlin Heidelberg, 2002.

SHIOTSU, S. Fertility study of *Stevia* decoction in rats. **TECH. J. FOOD CHEM.**, v.4, p.108-113, 1996.

SMIRNOVA, M. Investigation of the physiological and toxic actions of the sweetener stevioside. A literature review. **VOPROY PITANIYA**, v. 70, p. 41-44, 2001.

TAKAHASHI, K.; MATSUDA, M.; OSAHI, K.; TANIGUCHI, K.; NAKAGOMI, O.; ABE, Y.; MORI, S.; SATO, N.; OKUTAMI, K.; SHIGETA, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *S. rebaudiana*. **ANTIVIRAL RES.**, v. 49, p.15-24, 2001.

TANAKA, O. Improvement of taste of natural sweeteners. **PURE & APPL. CHEM.**, v. 69, n.4, p.675-683, 1997.

TOTTÉ, N.; CHARON, L.; ROHMER, M.; COMPERNOLLE, F.; BABOEUF, I.; GEUNS, J. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *S. rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. **TETRAHEDRON LETT.**, 41, pg. 6407-6410, 2000.

TOYODA, K.; MATSUI, H.; SHODA, T.; UNEYAMA, C.; TAKADA, K.; TAKAHASHI, M. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 Rats. **FOOD CHEM. TOXICOL.**, v.35, p.597-603, 1997.

TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. **APPL. MICROBIOL. BIOT.**, v.52, n.3, p. 298-310, 1999.

XI, Y.; YAMAGUCHI, T.; SATO, M.; TAKEUCHI, M. Antioxidant mechanism of *S. rebaudiana* extract and antioxidant activity of inorganics salts. **NIPPO SHOKUHIN KAGAKU KAISHI**, v.45, p. 317-322, 1998.

ZUBTISOV, V.; OSIPOVA, L.; LEBEDEVA, T.; ANTIPOVA, N. Steviya – lekarstvennoe i pishchevoe rastenie, Rastitel'nye resursy dlya zdorov'ya cheloveka. Mater. 1 Meezhdunar. Nauch.-Praktich. Konf. (Plan Resources for Human Health. Proc. 1st Int. Scientific Methodol. Conf.), Moscow: Ares, p. 356-358, 2002.

YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, K.; OKADA, S. Effective production of glycosyl-steviosides by alpha-1,6 transglucosylation of dextrina dextranase. **BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM.**, v. 58, n.9, p. 1657-1661, 1994.

YASUKAWA, K.; KITANAKA, S.; SEO, S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **BIOL. PHARM. BULL.**, v.25, p.144-1490, 2002.

6 ANEXOS

Figura 36 - Espectro de massas do esteviosídeo (MS1)

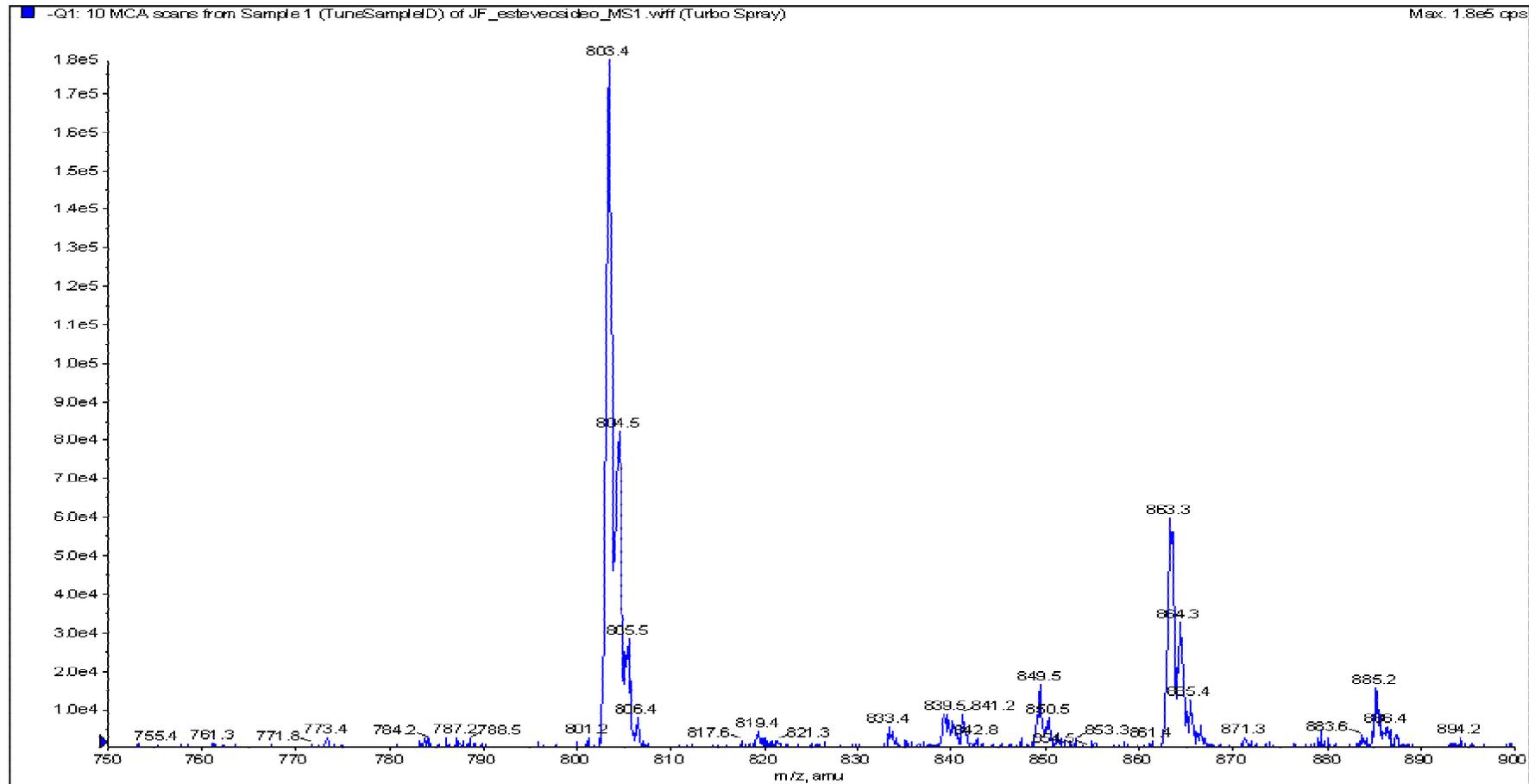


Figura 37 - Espectro de massas do esteviosídeo (MS2)

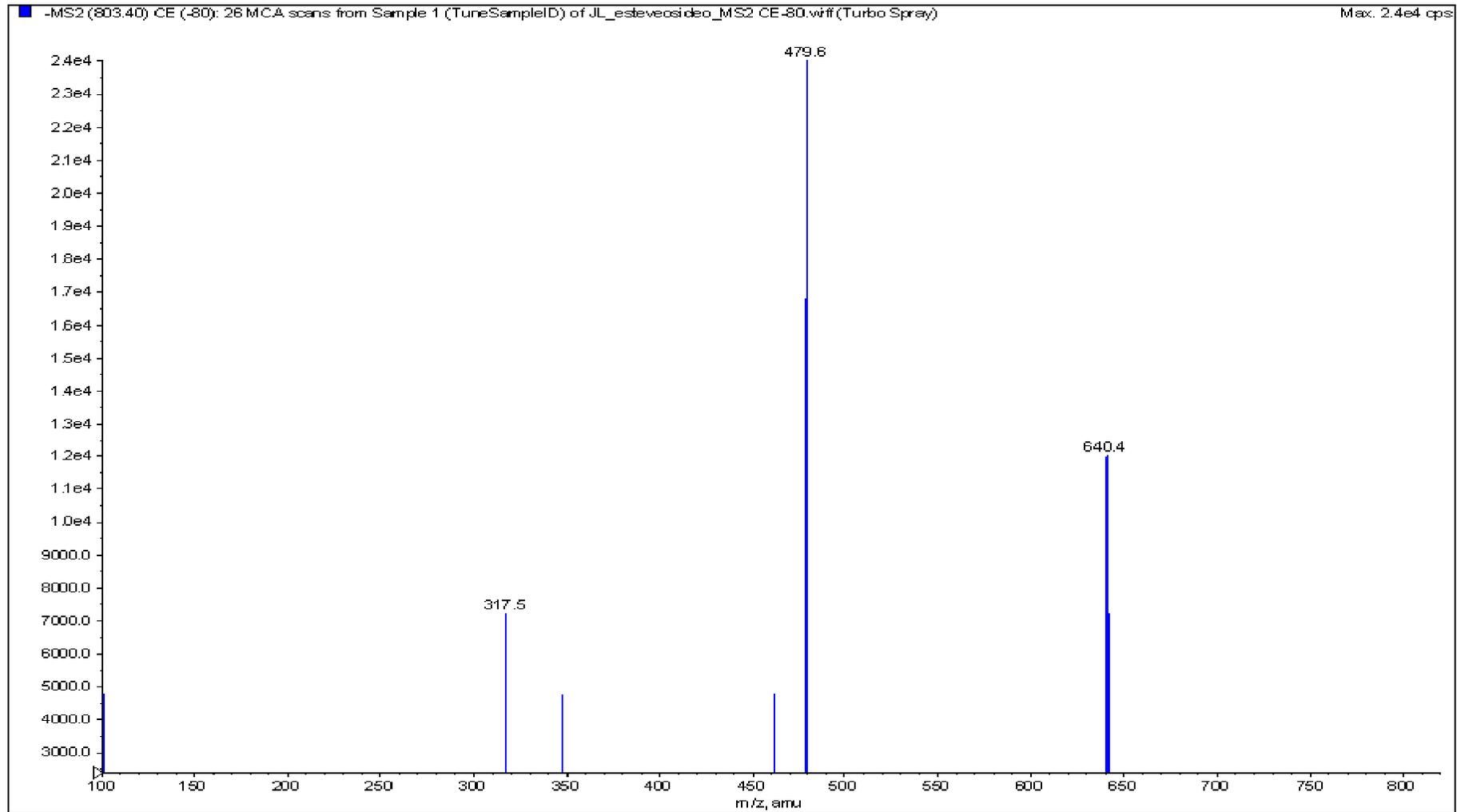


Figura 38 - Espectro no IV do esteviosídeo

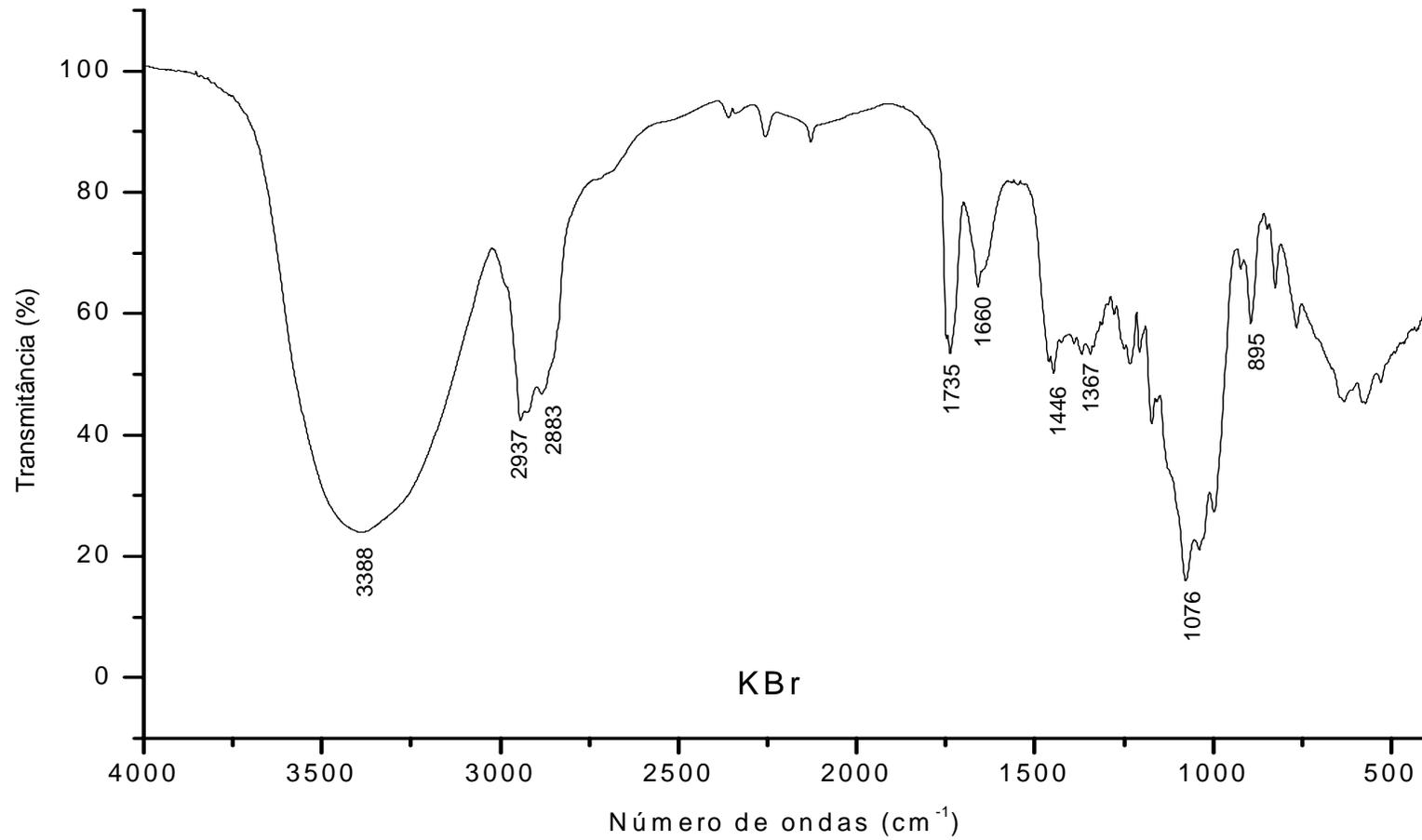


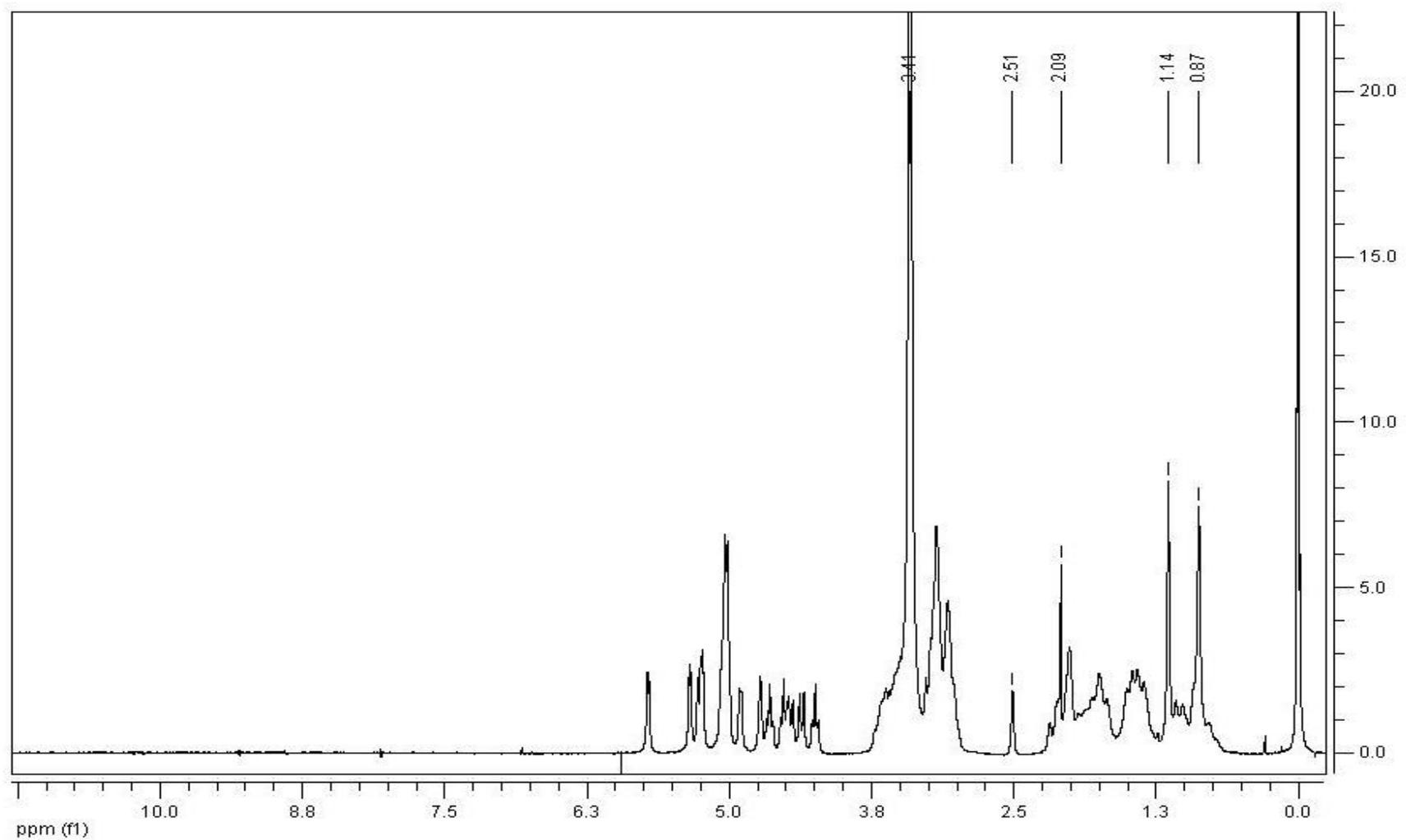
Figura 39 - Espectro de RMN ^1H do esteviosídeo

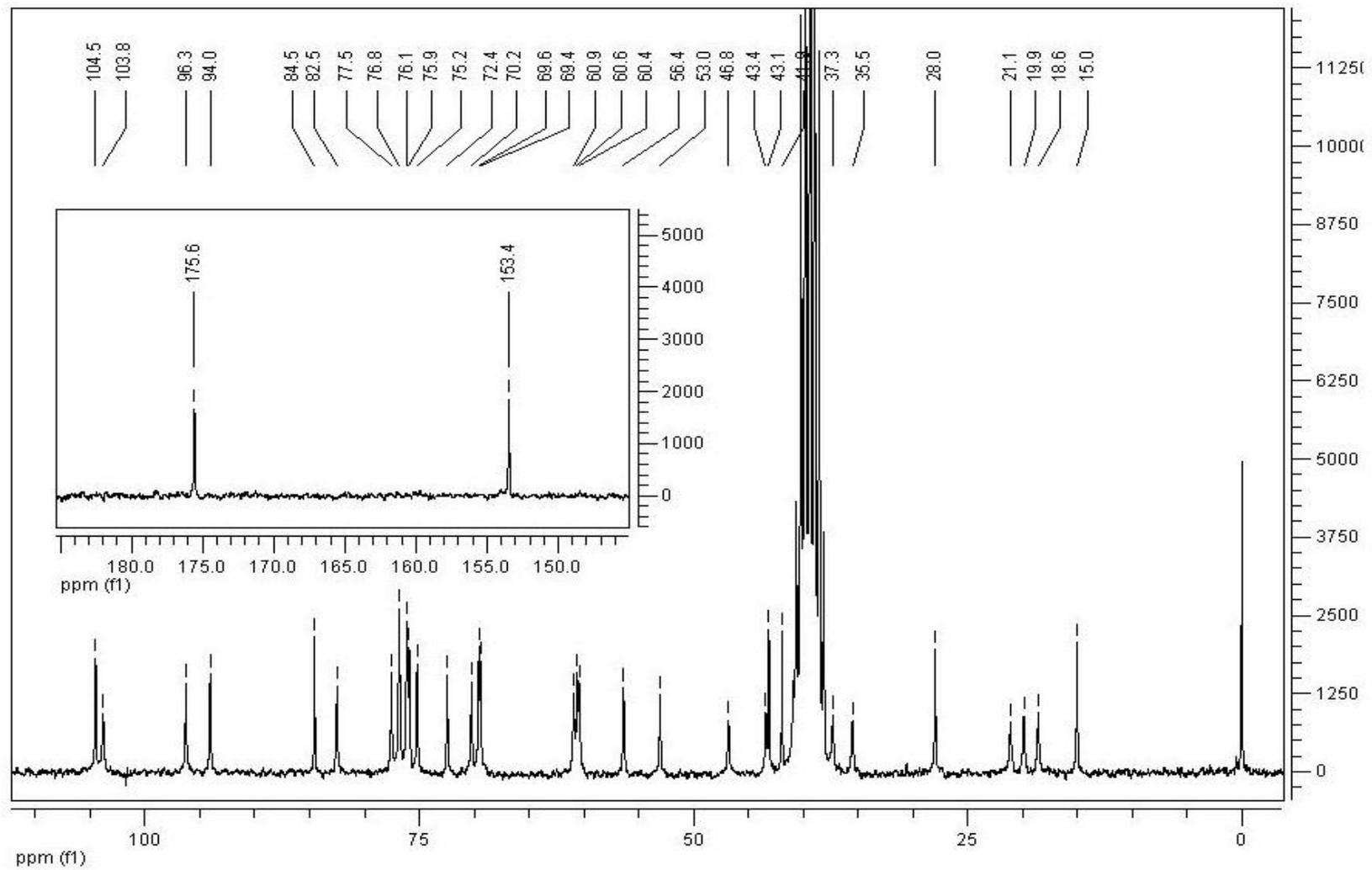
Figura 40 - Espectro de RMN ^{13}C do esteviosídeo

Figura 41 - Espectro de massas do rebaudiosídeo A (MS1)

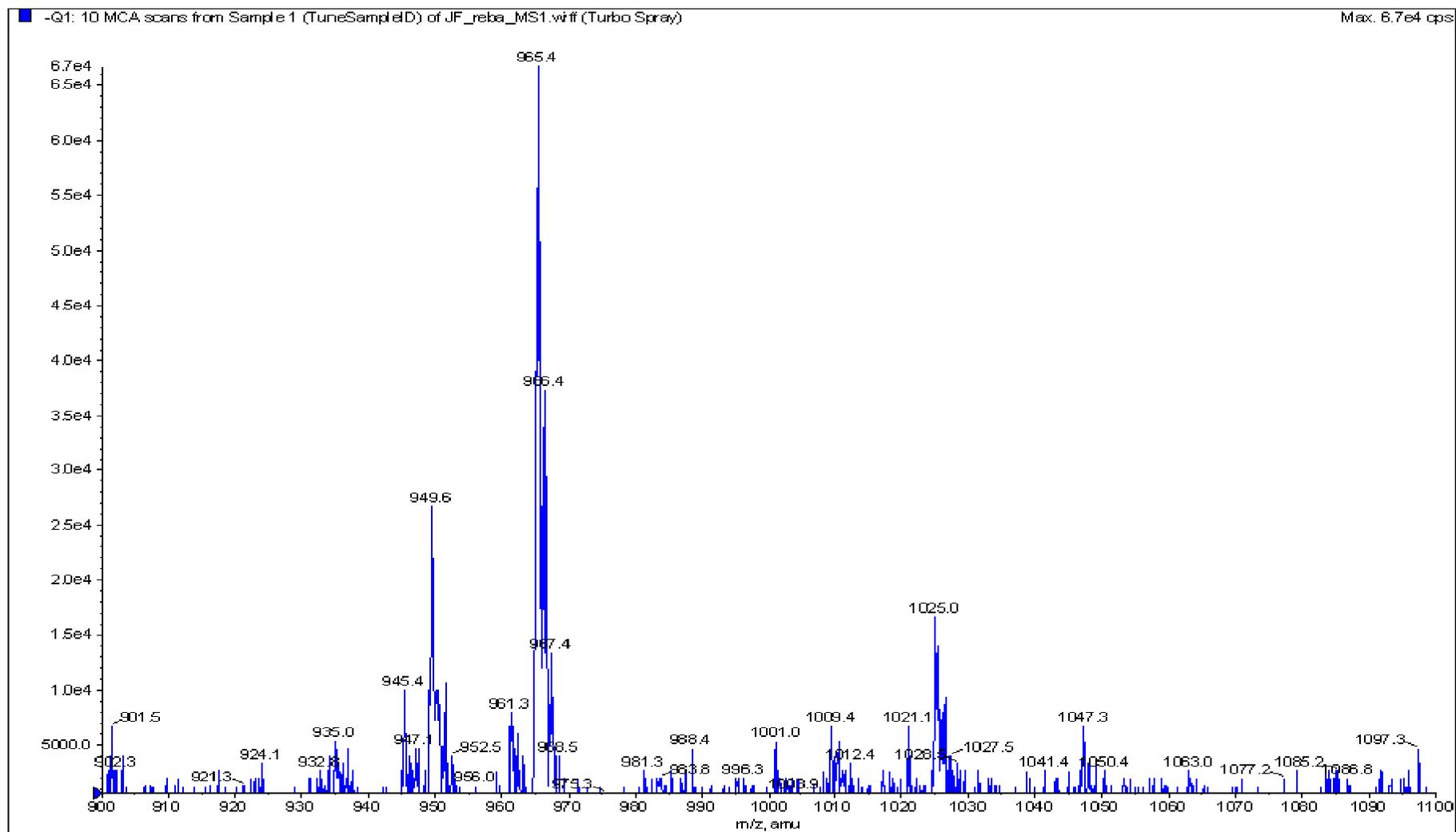


Figura 42 - Espectro de massas do rebaudiosídeo A (MS2)

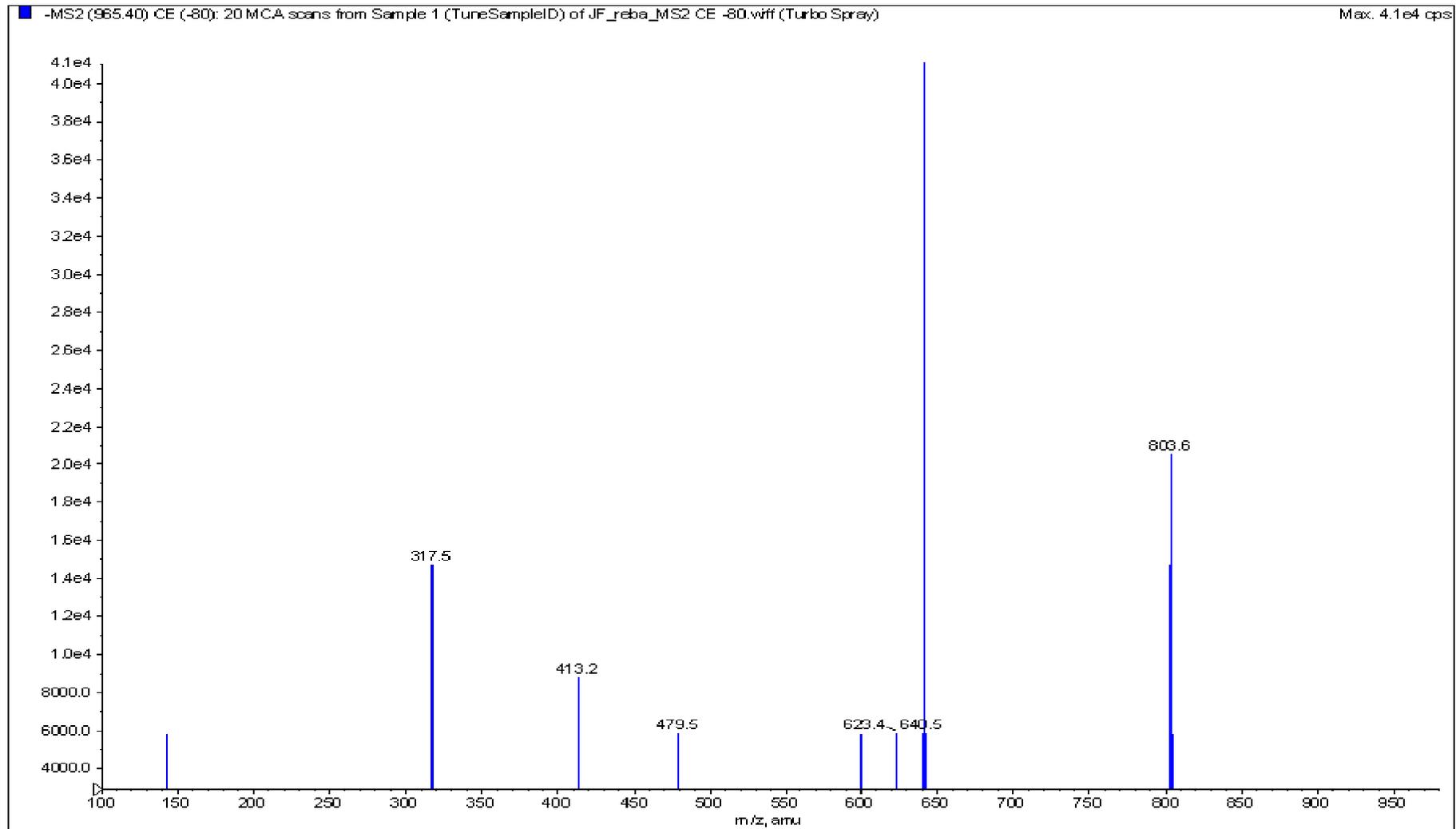


Figura 43 - Espectro de massas do esteviolbiosídeo (MS1)

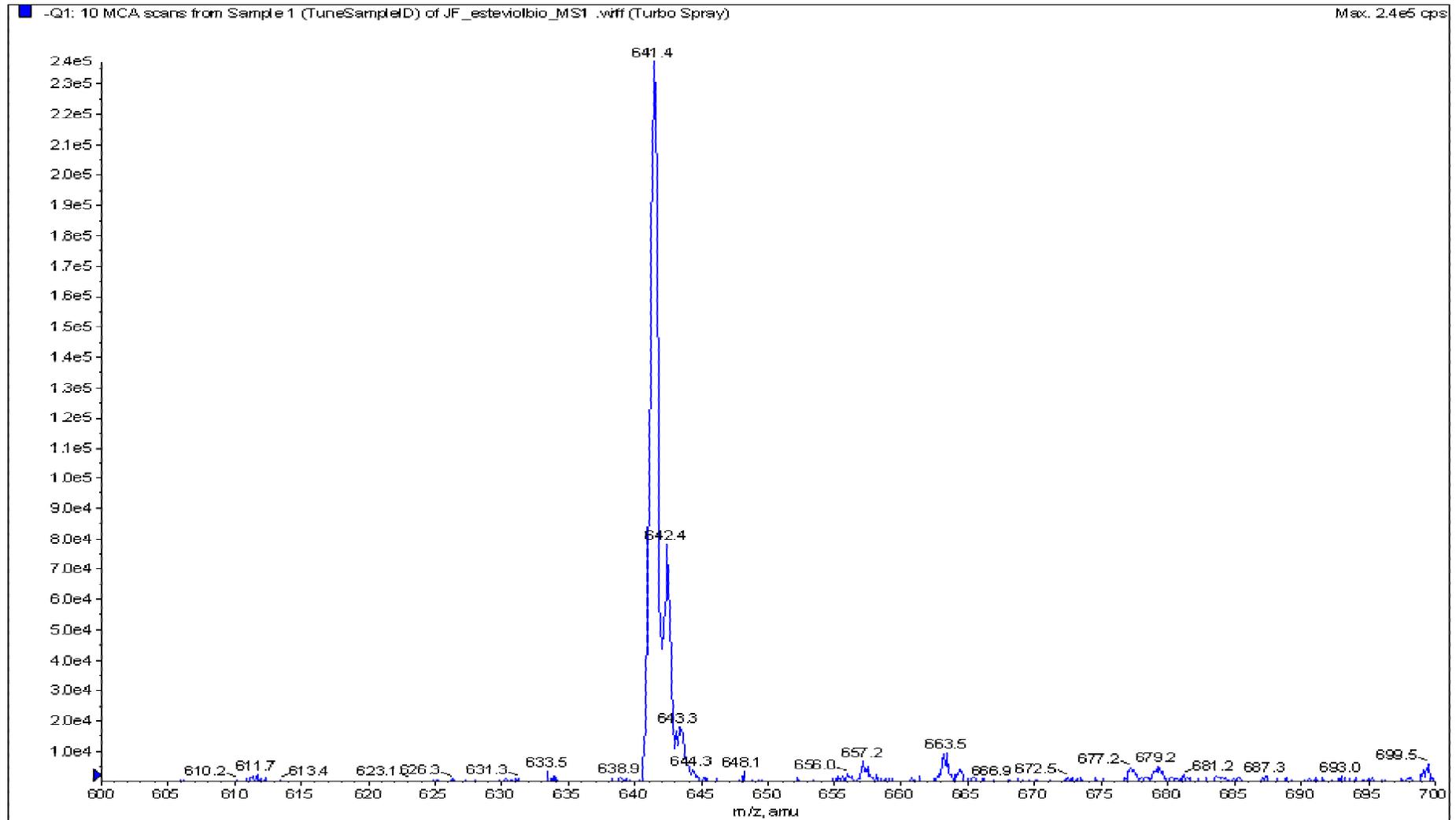


Figura 44 - Espectro de massas do esteviolbiosídeo (MS2)

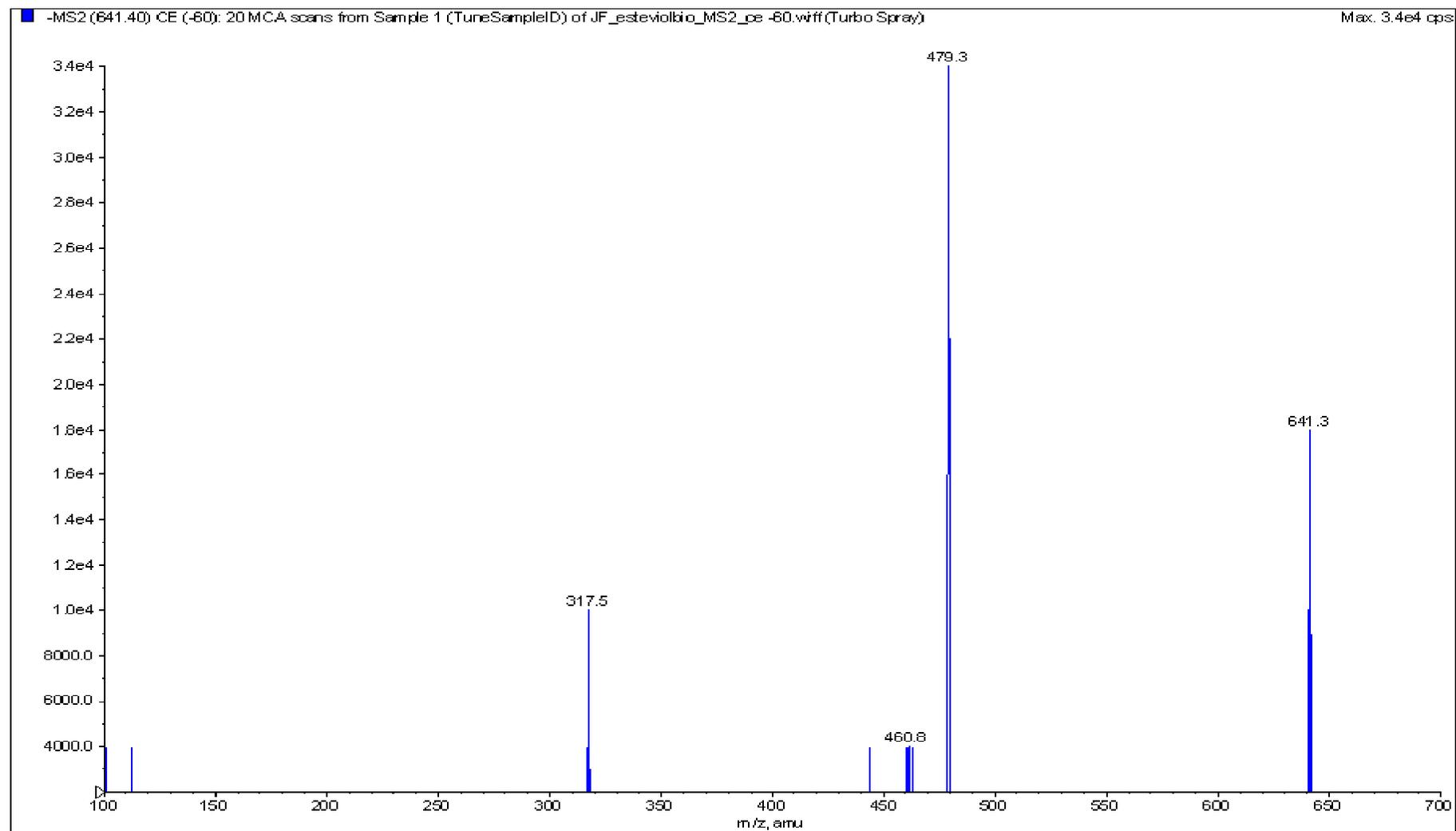


Figura 45 - Espectro no IV do esteviolbiosídeo

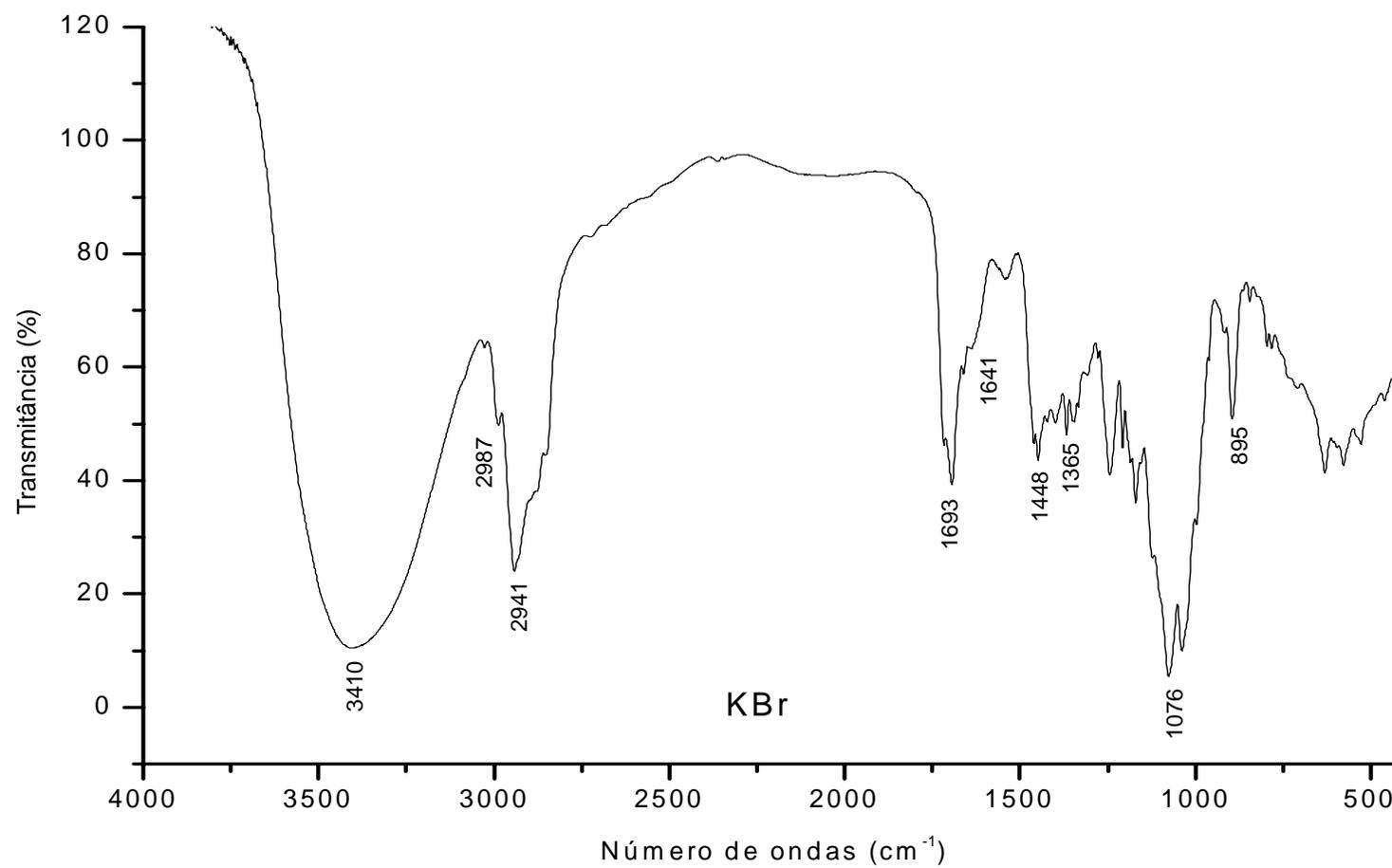


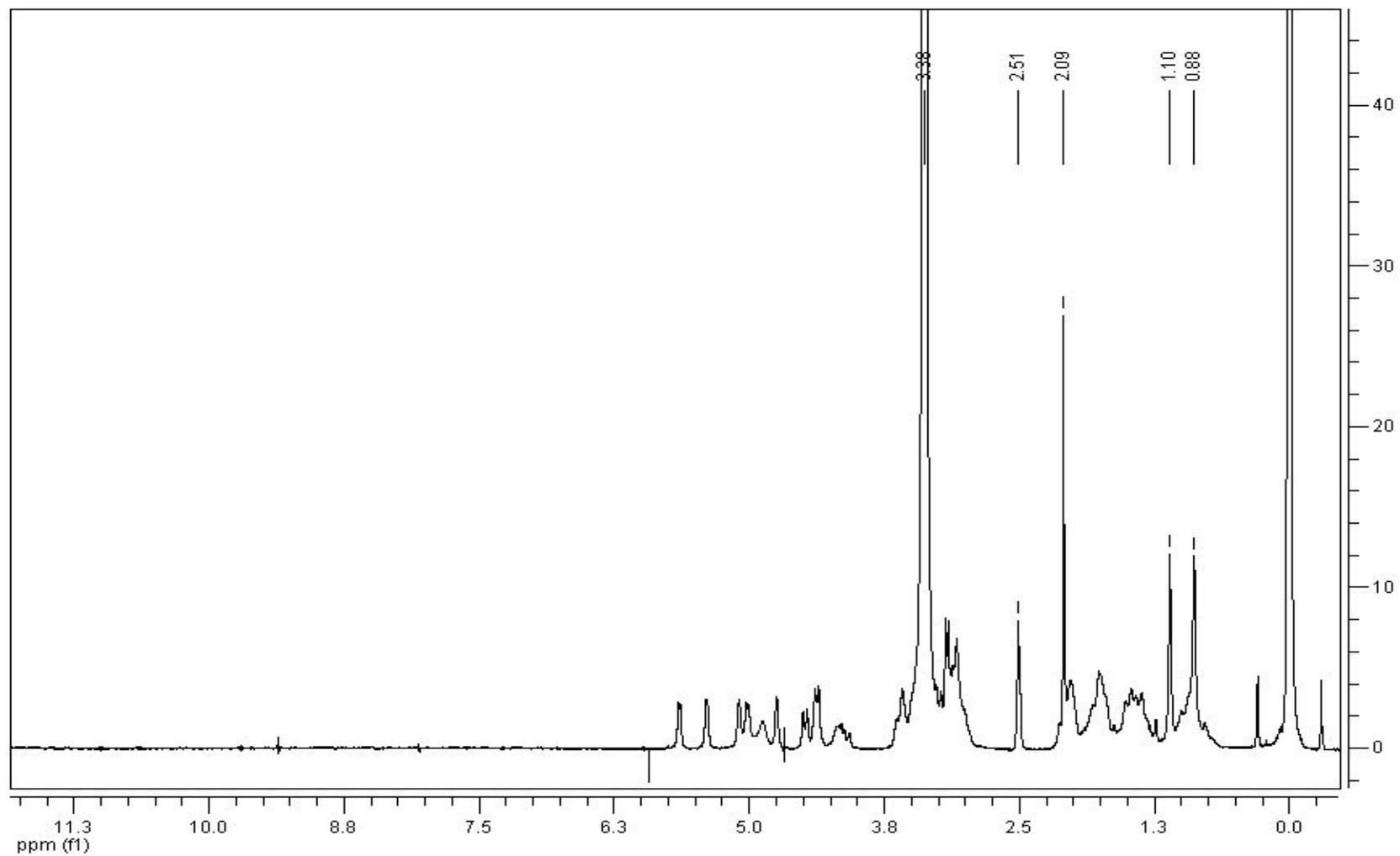
Figura 46 - Espectro de RMN ^1H do esteviolbiosídeo

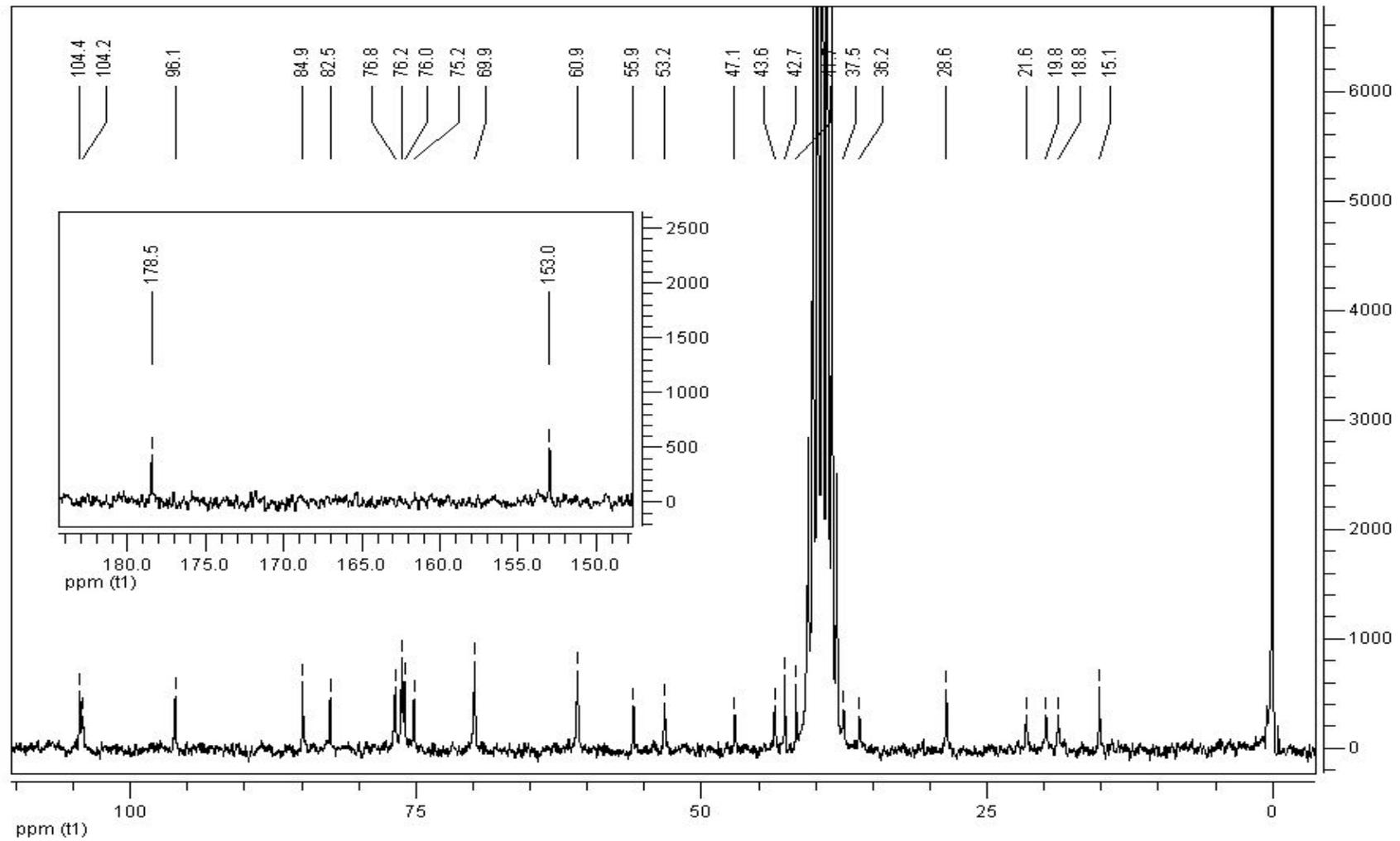
Figura 47 - Espectro de RMN ^{13}C do esteviolbiosídeo

Figura 48 - Espectro de massas do rebaudiosídeo B (MS1)

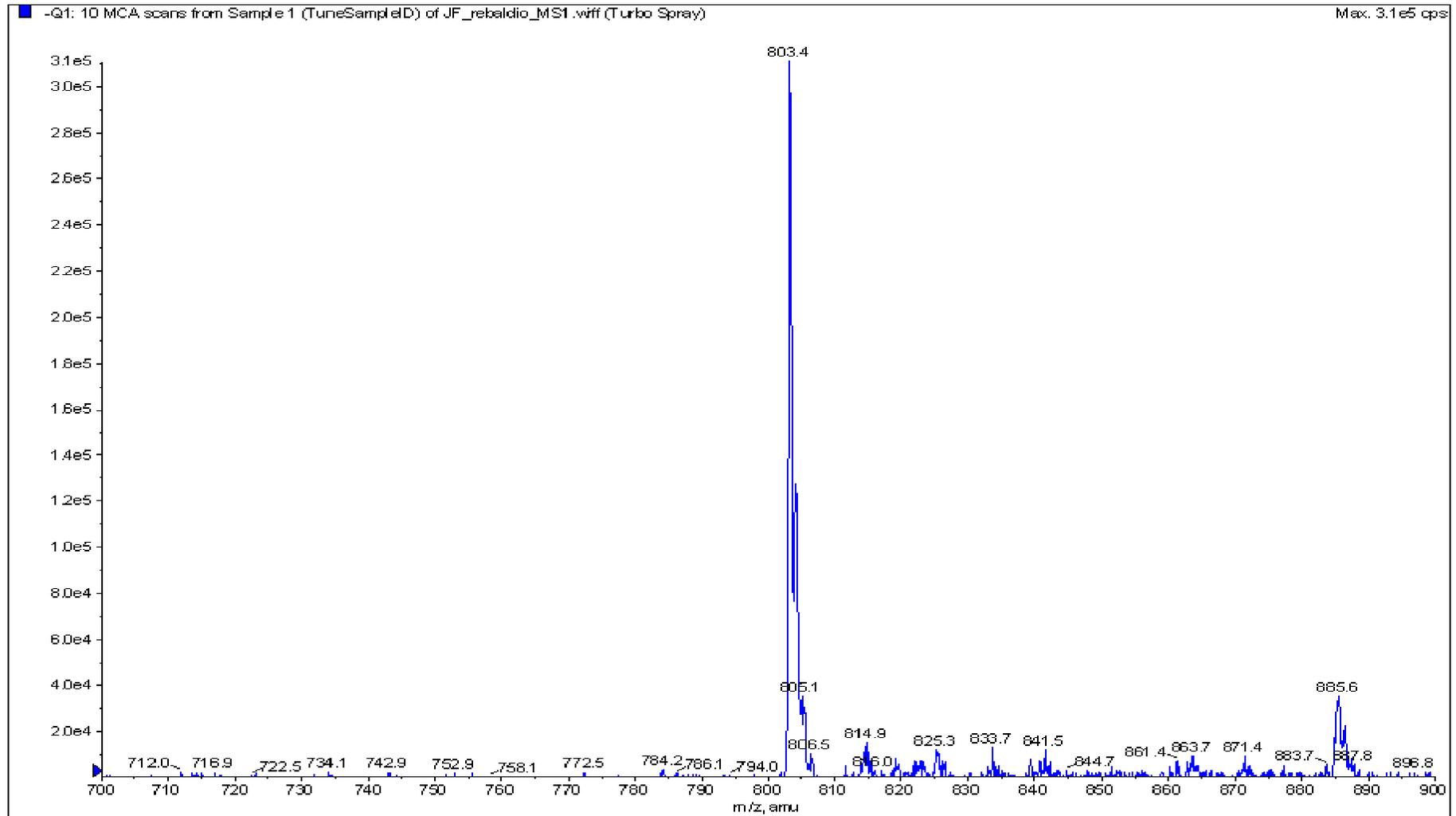


Figura 49 - Espectro de massas do rebaudiosídeo B (MS2)

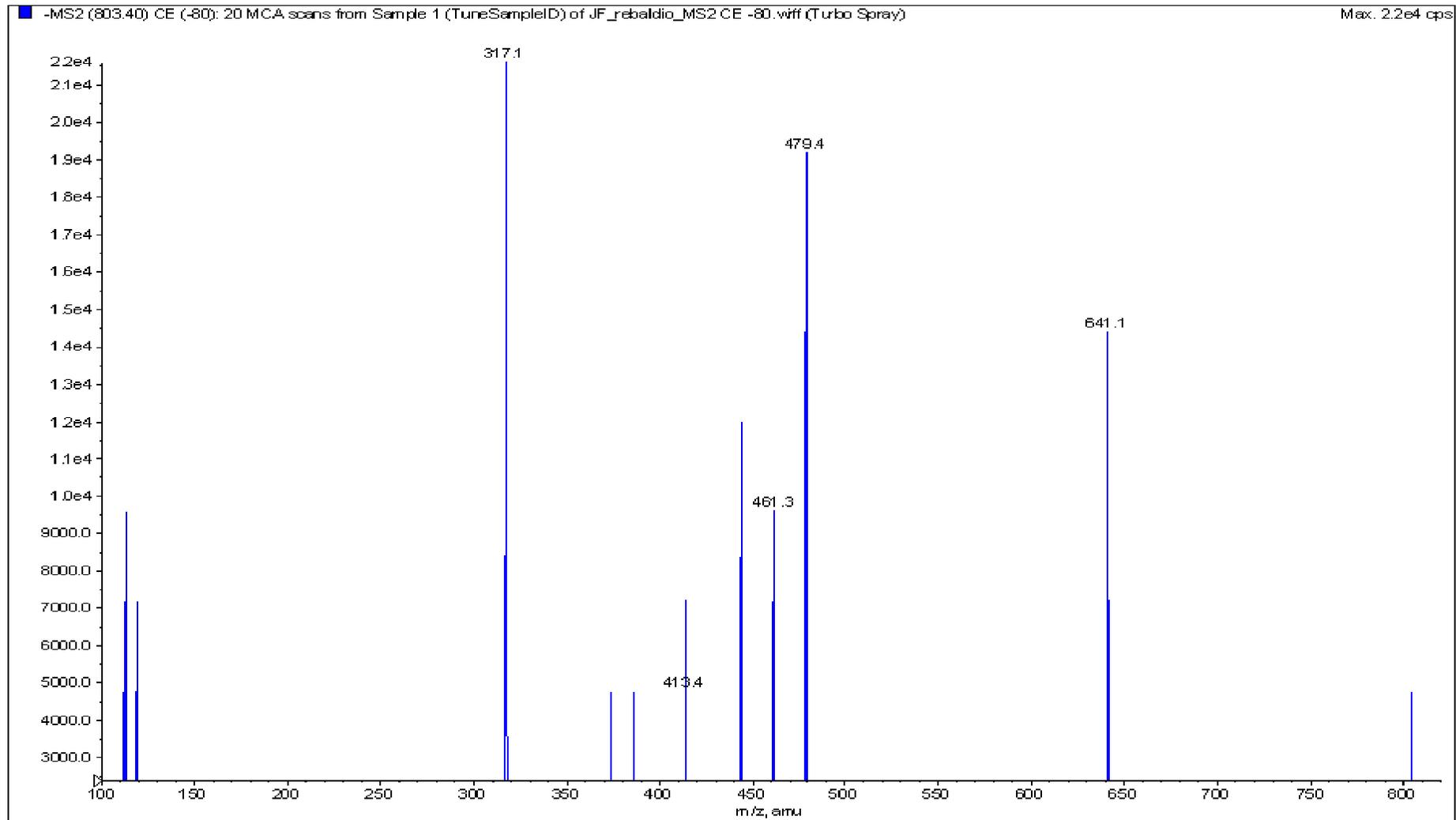


Figura 50 - Espectro de massas do esteviol (MS1)

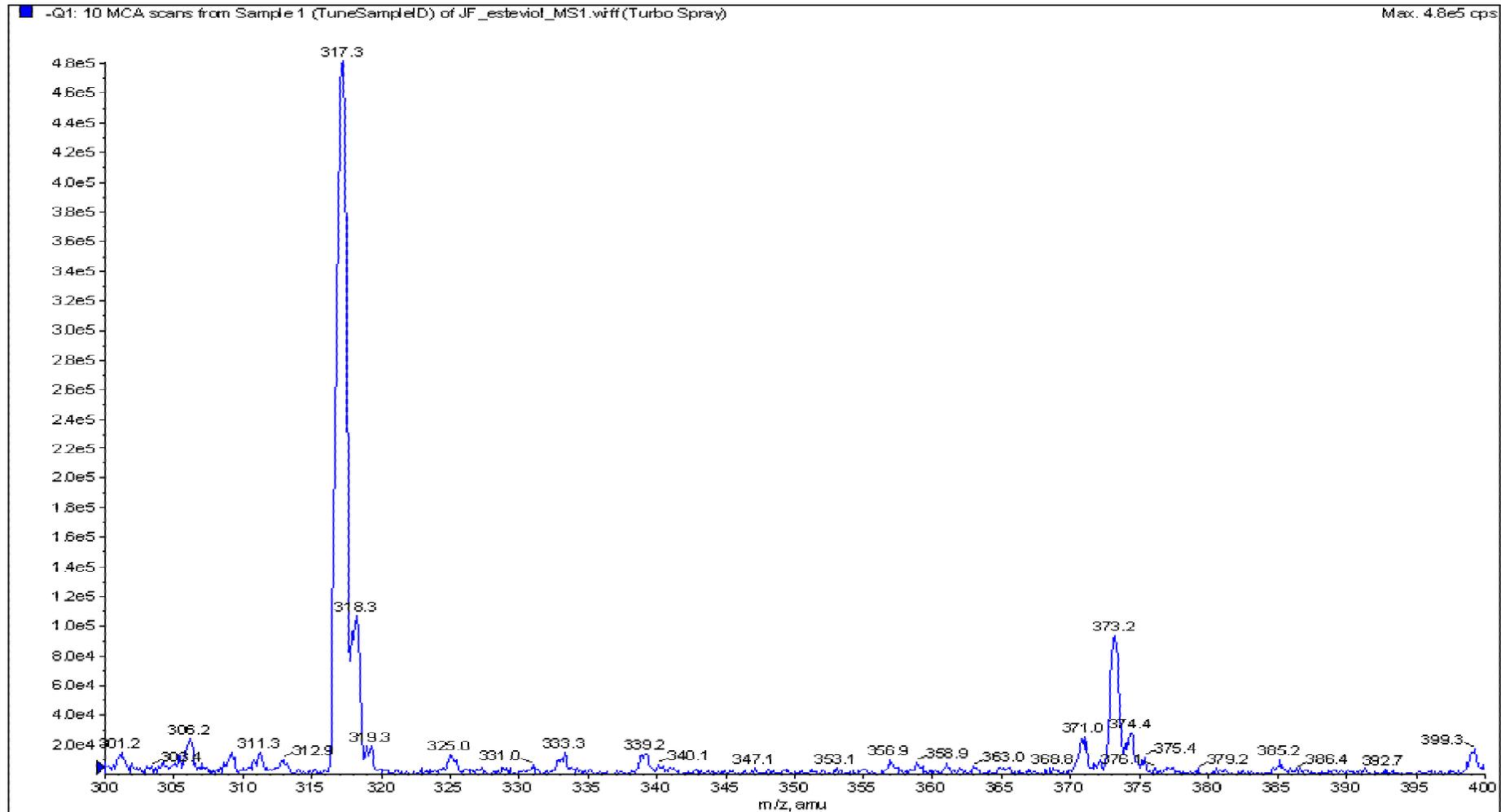


Figura 51 - Espectro de massas do esteviol (MS2)

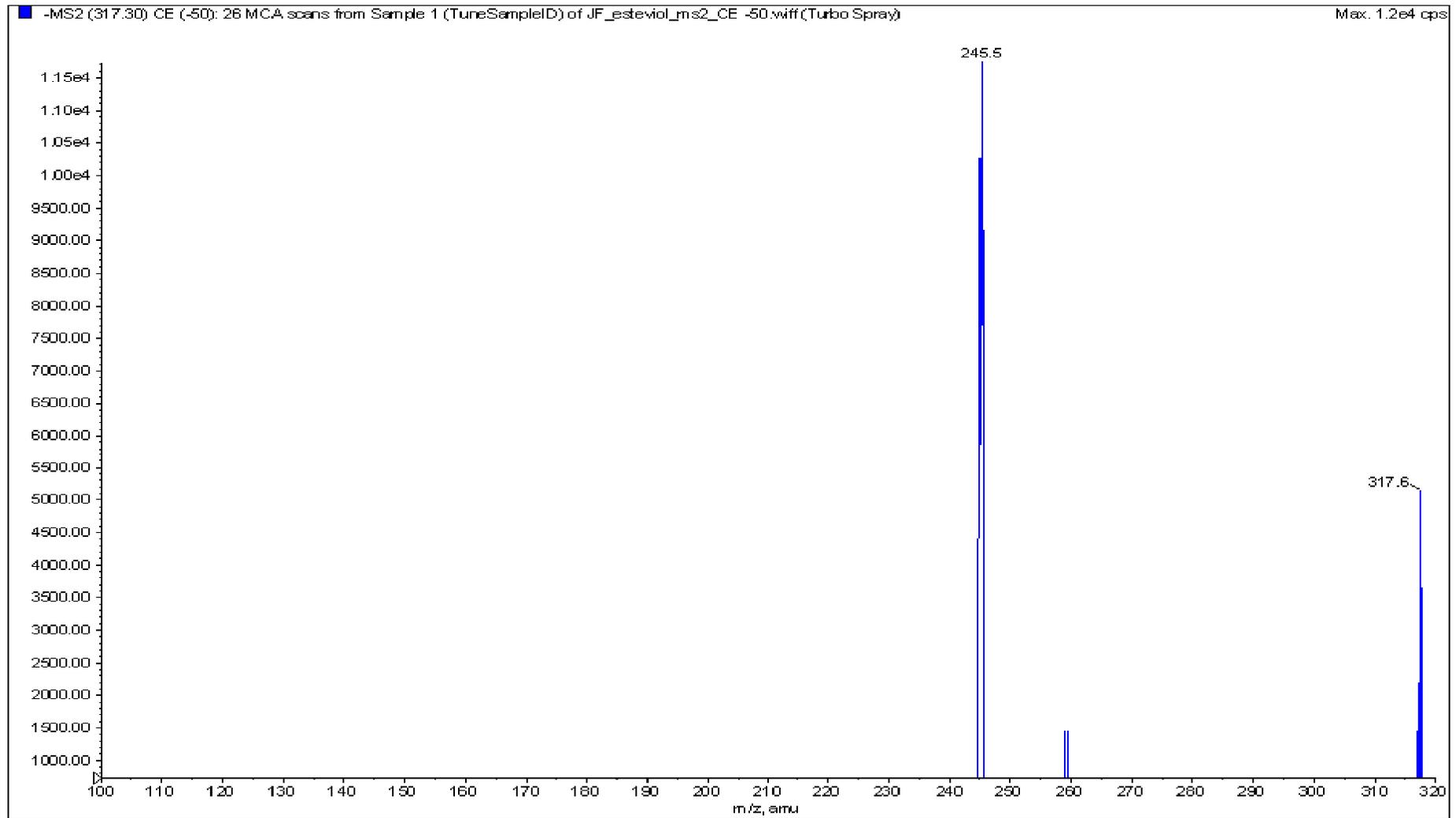


Figura 52 - Espectro no IV do esteviol

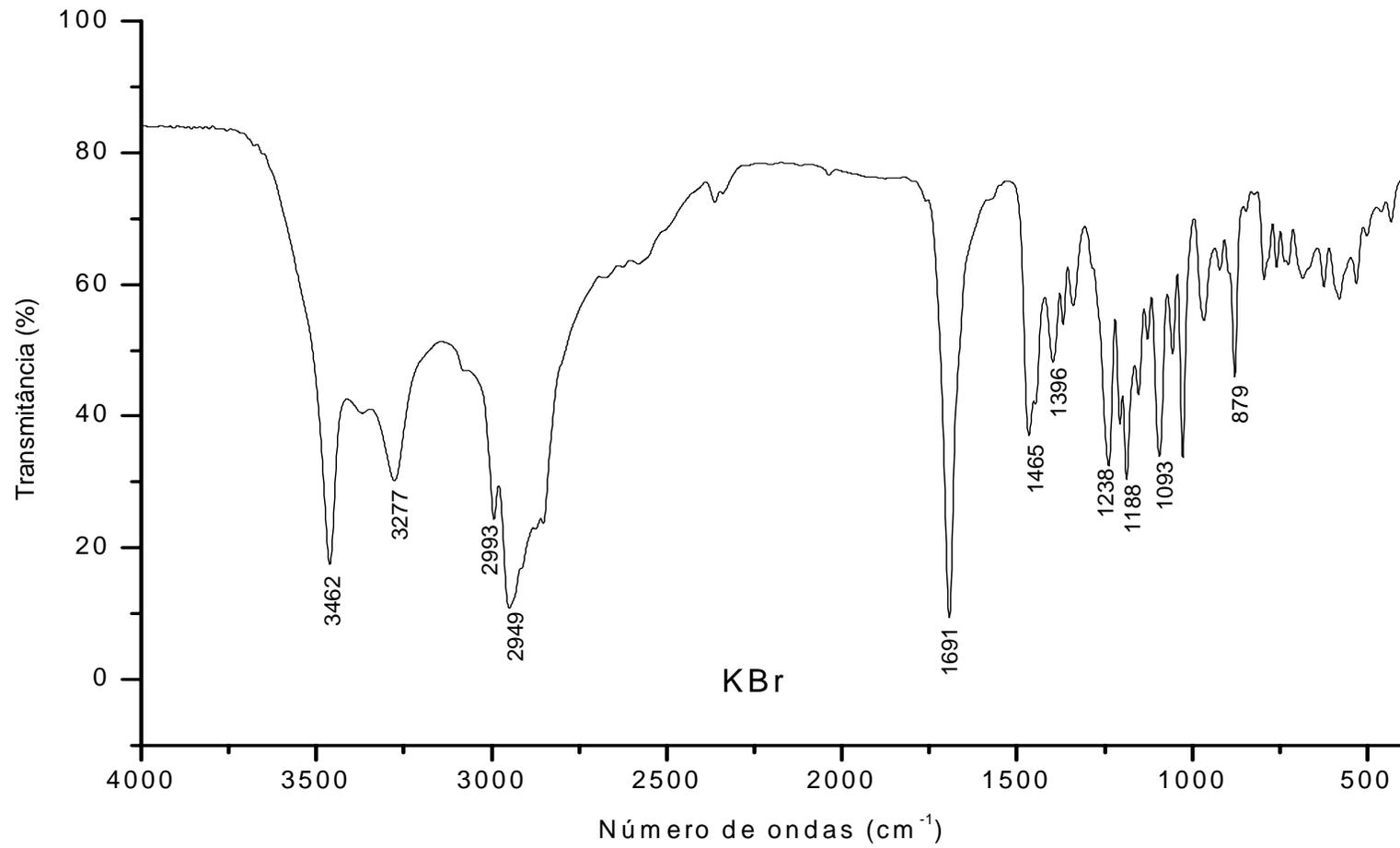


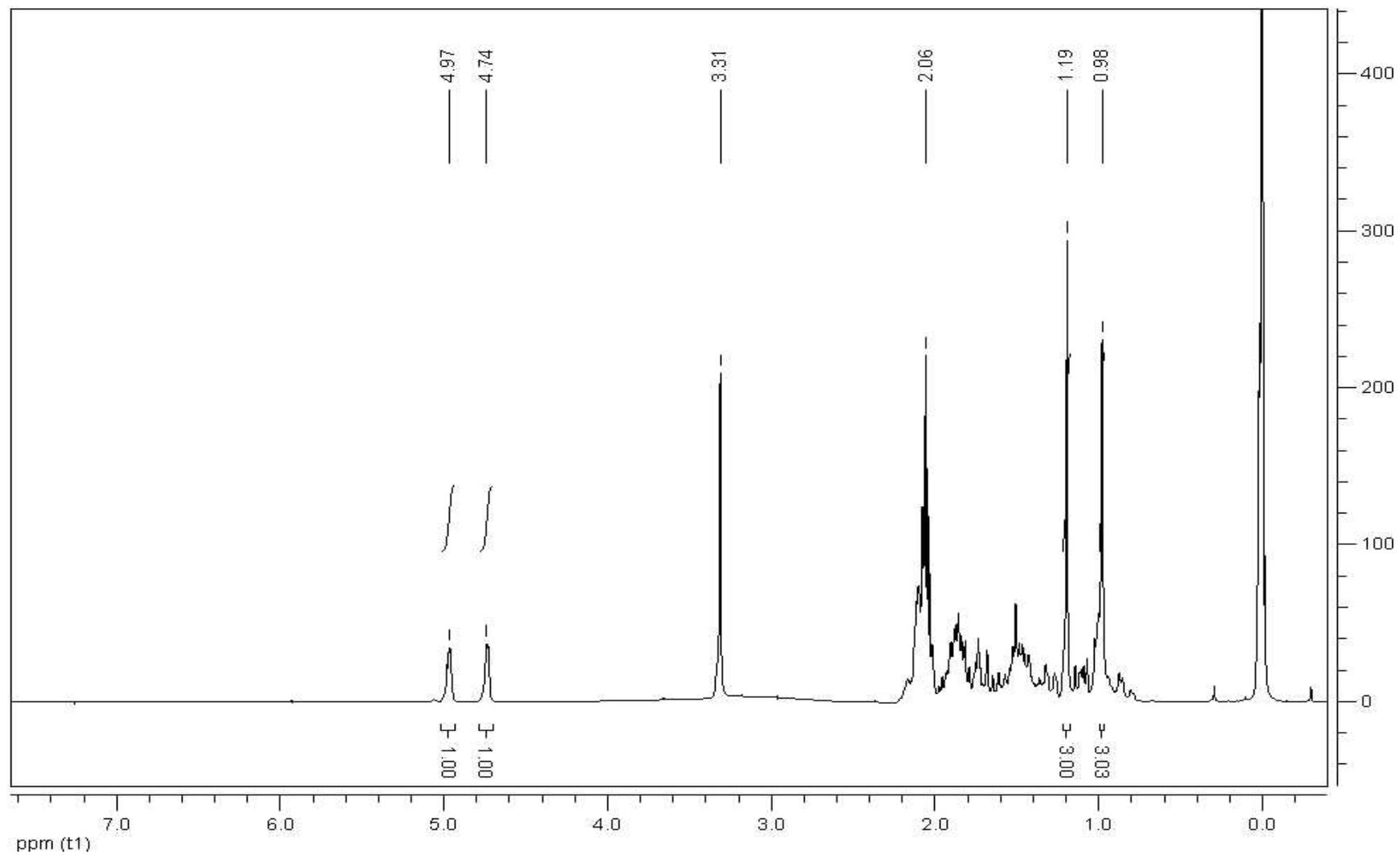
Figura 53 - Espectro de RMN ^1H do esteviol

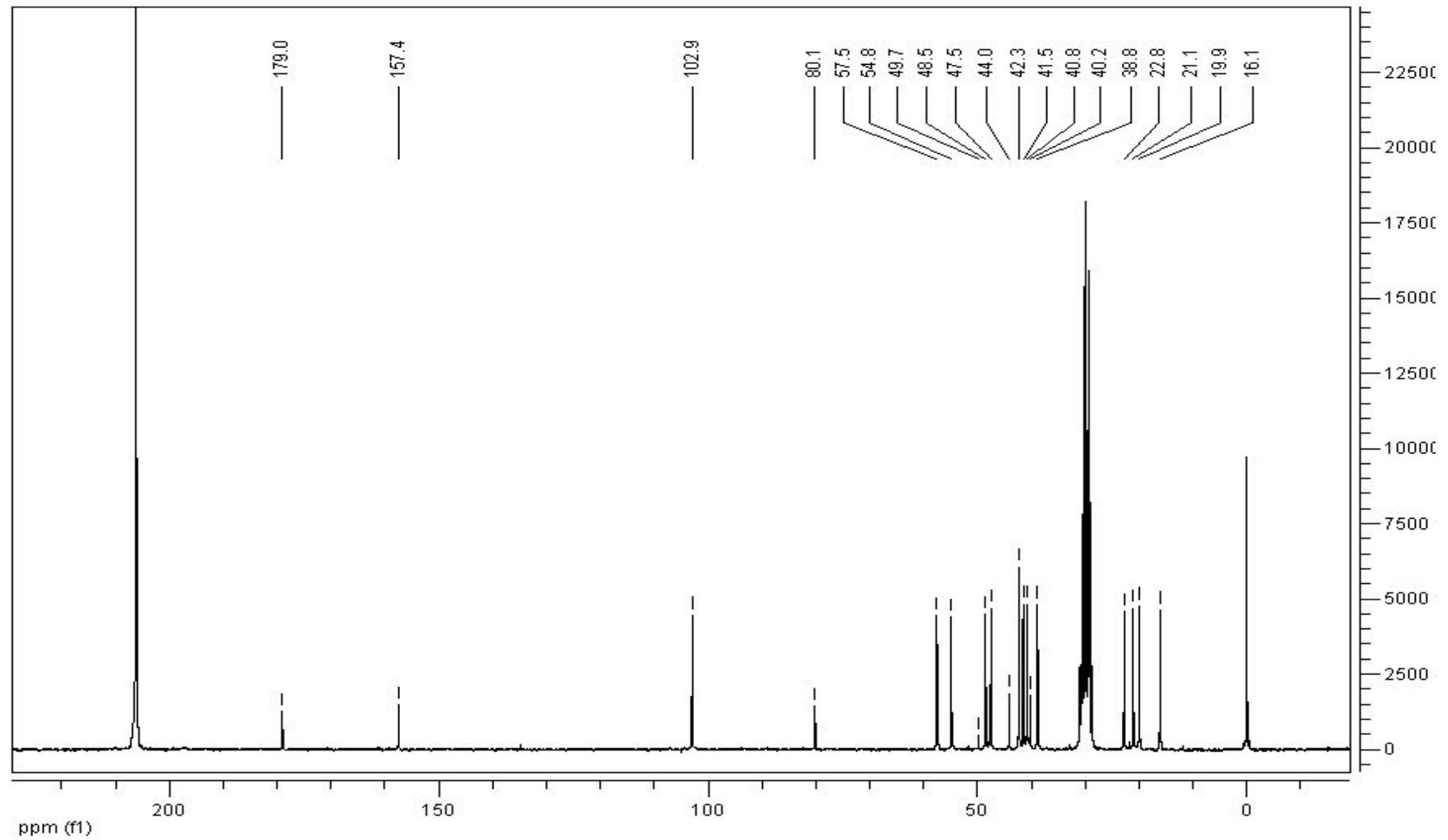
Figura 54 - Espectro de RMN ^{13}C do esteviol

Figura 55 - Espectro de massas do isoesteviol (MS1)

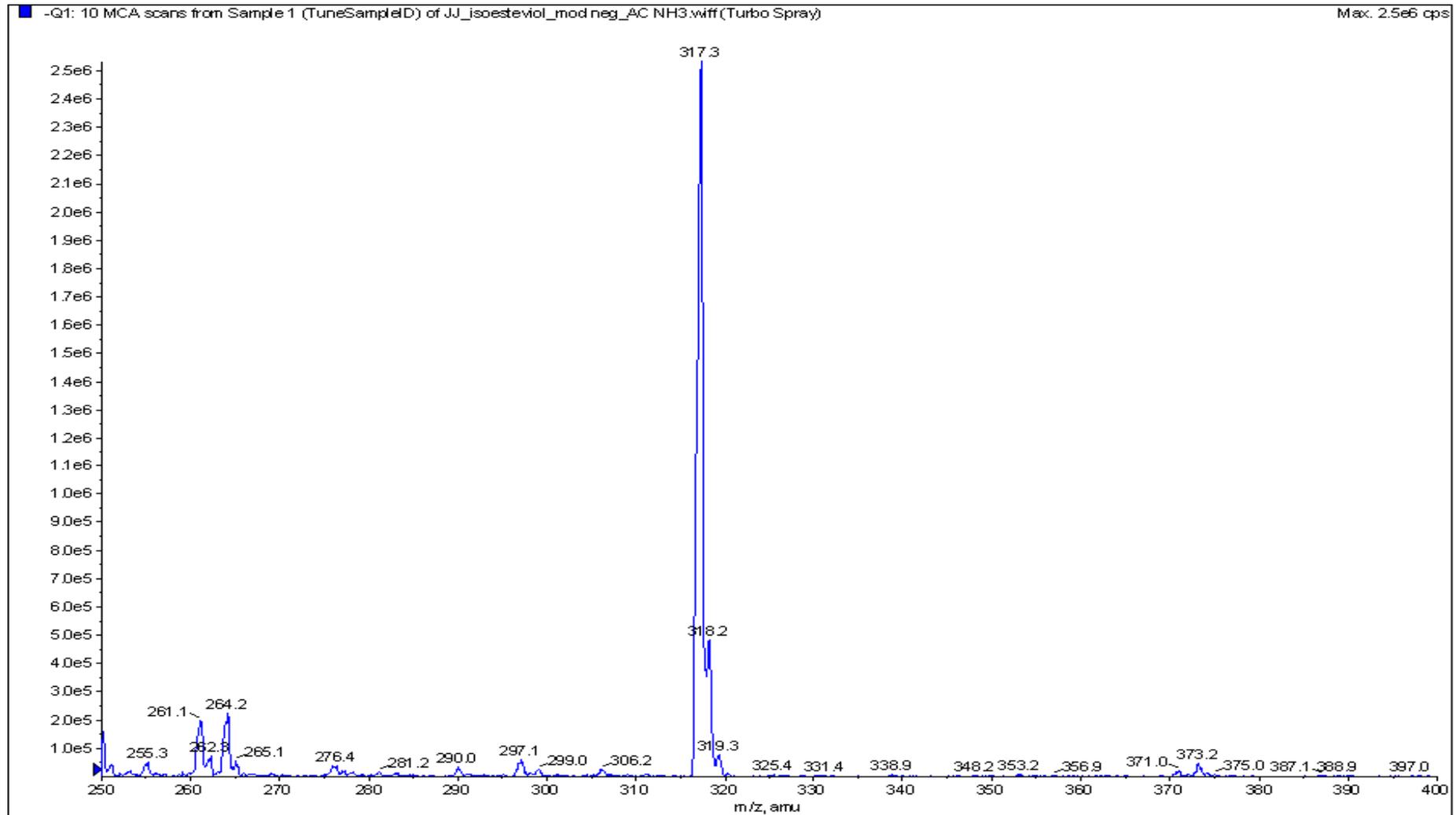


Figura 56 - Espectro no IV do isoesteviol

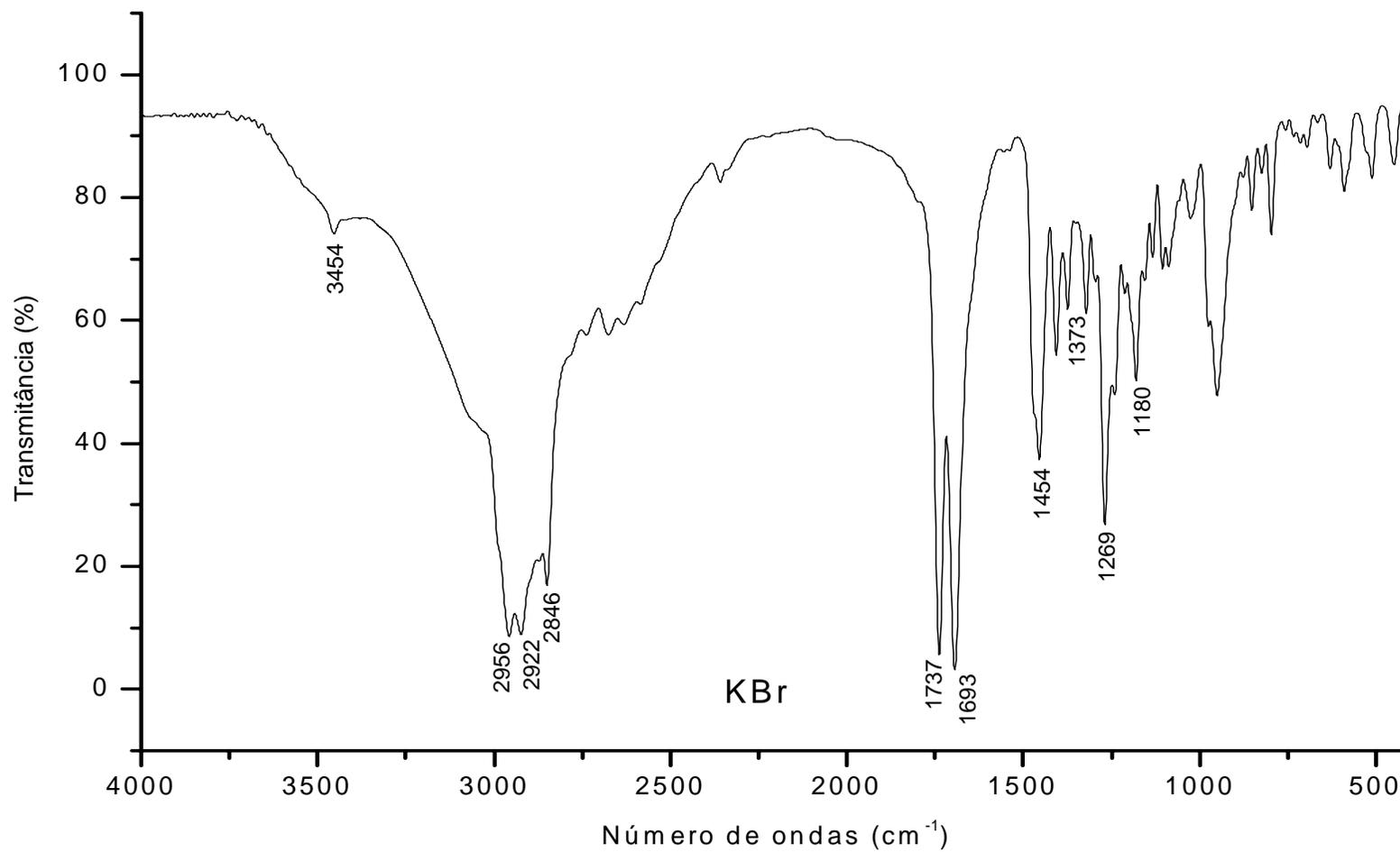


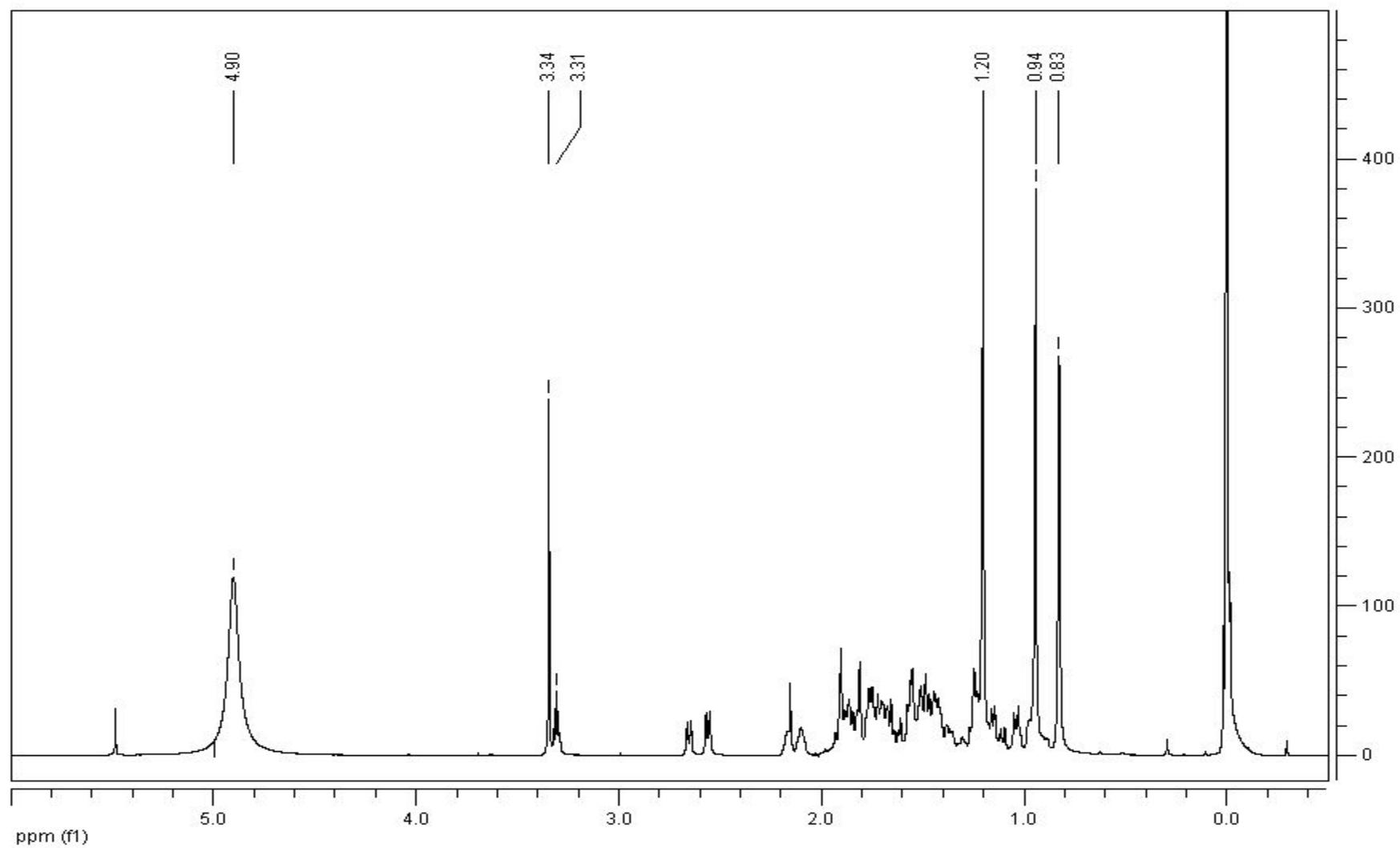
Figura 57 - Espectro de RMN ^1H do isoesteviol

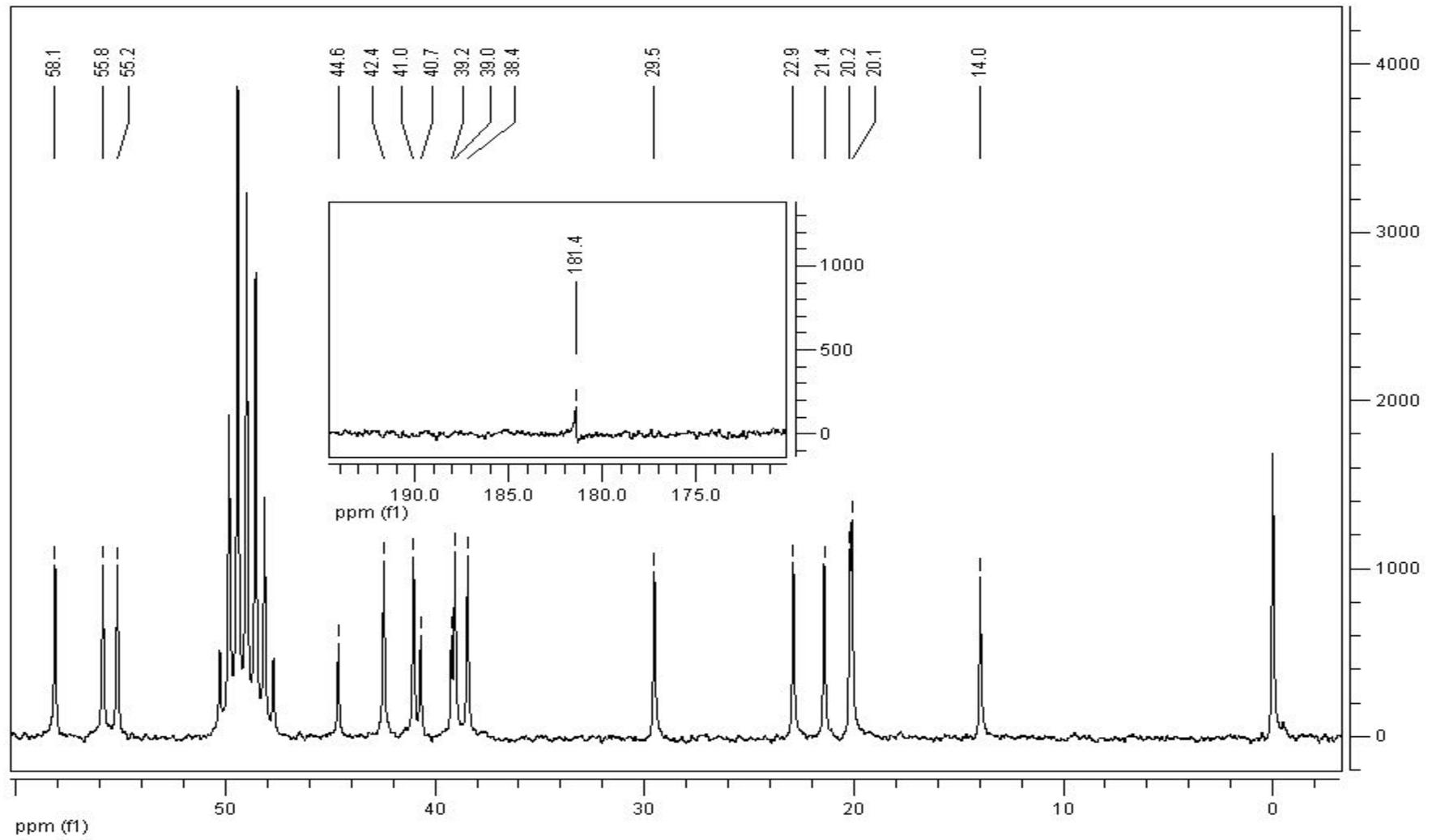
Figura 58 - Espectro de RMN ^{13}C do isoesteviol

Figura 59 - Espectro de massas do produto obtido da modificação enzimática da Stevita Cristal® (ES)

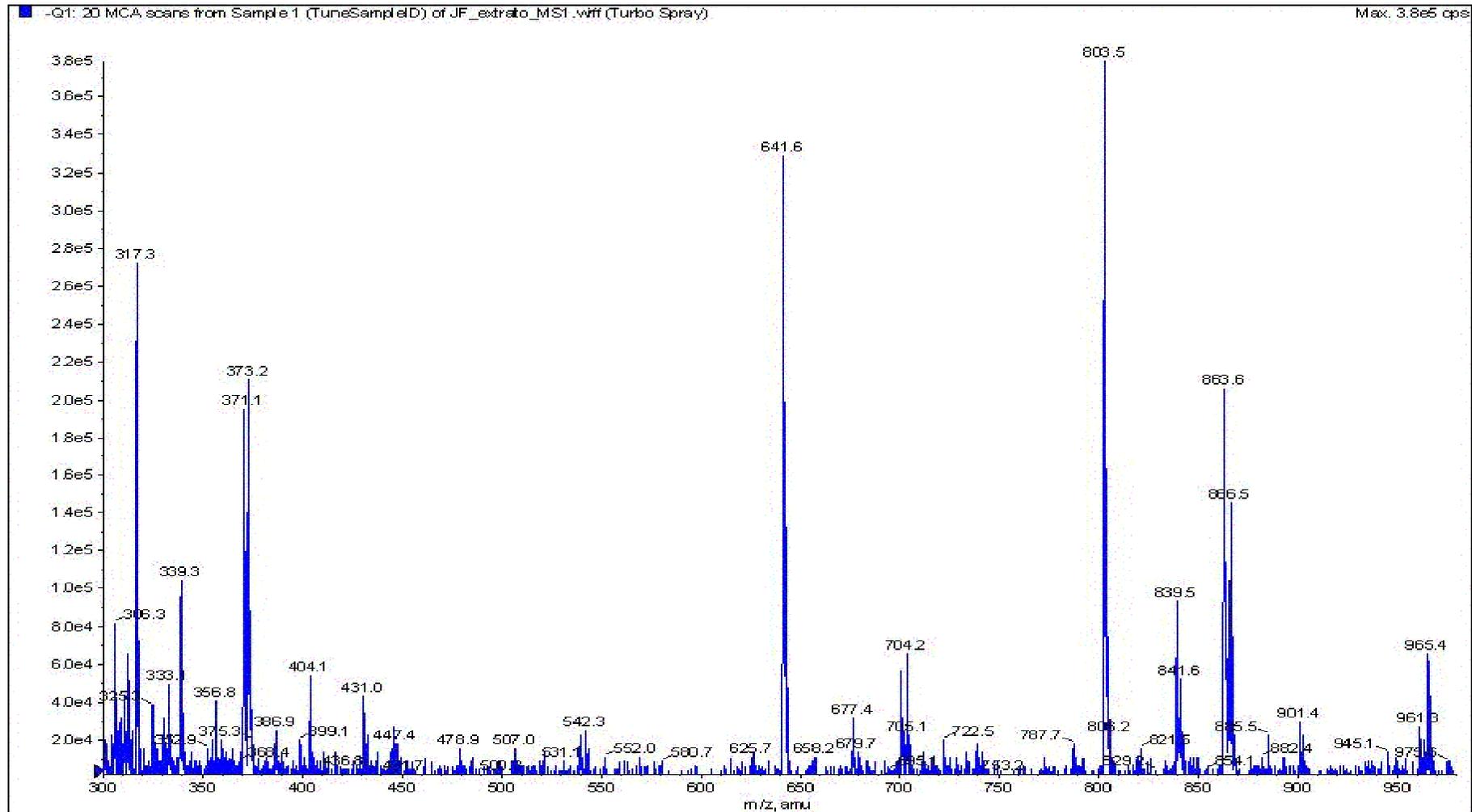


Figura 60 - Espectro do esteviosídeo e rebaudiosídeo A purificados (MRM)

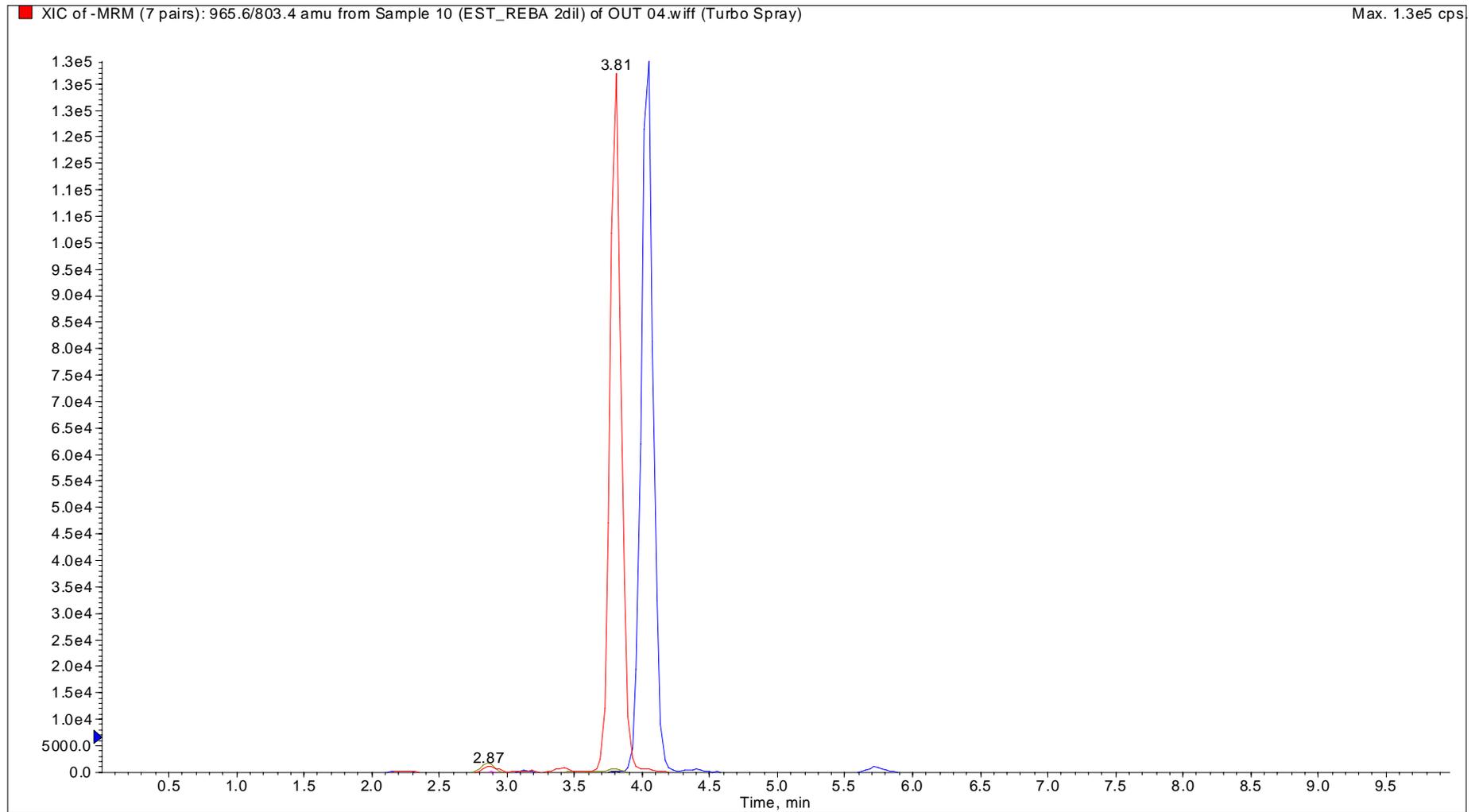


Figura 61 - Espectro do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A biotransformados (MRM)

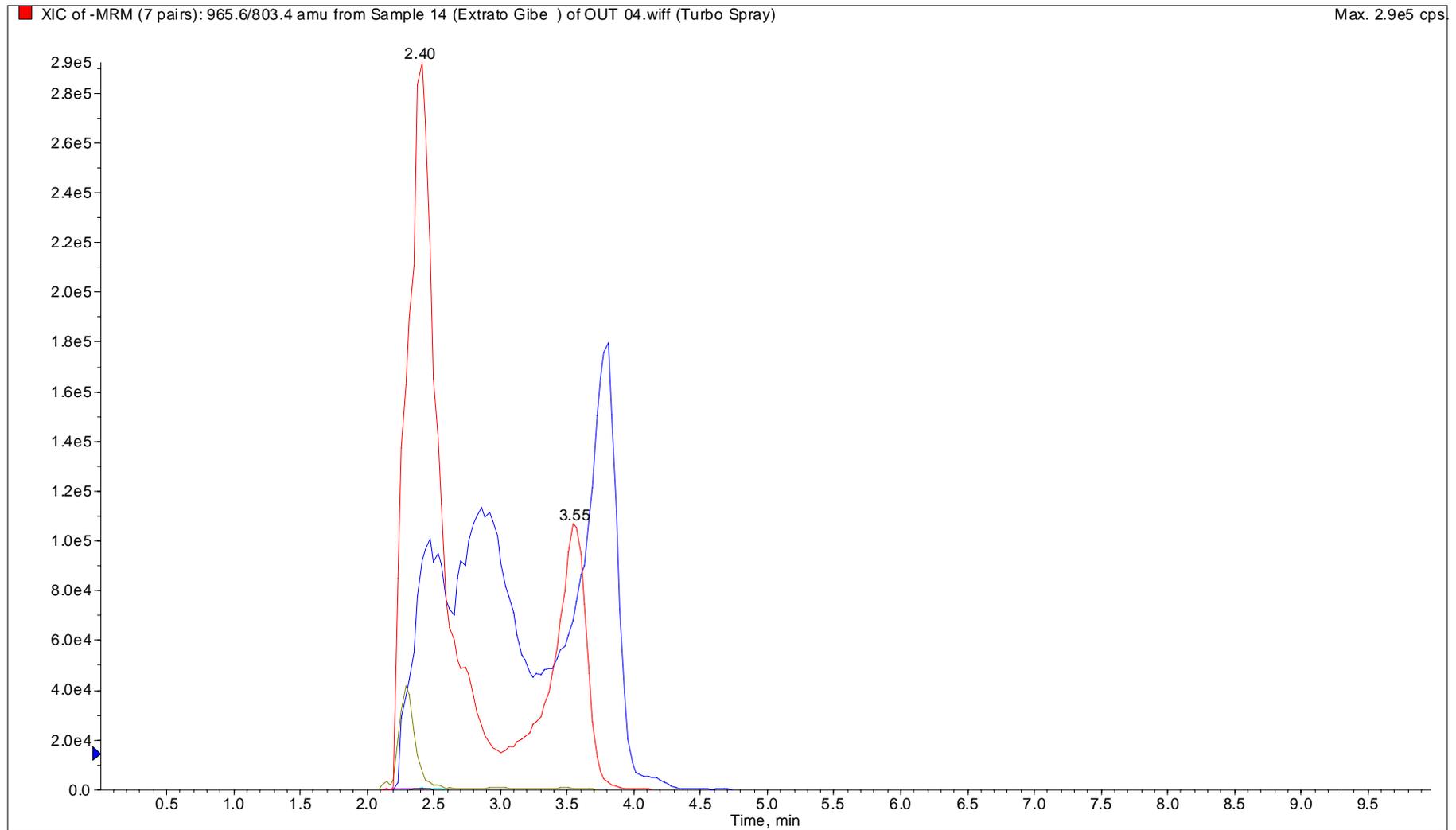


Figura 62 - Espectro de massas do produto obtido da modificação enzimática da Stevita Cristal® (RA): modo positivo

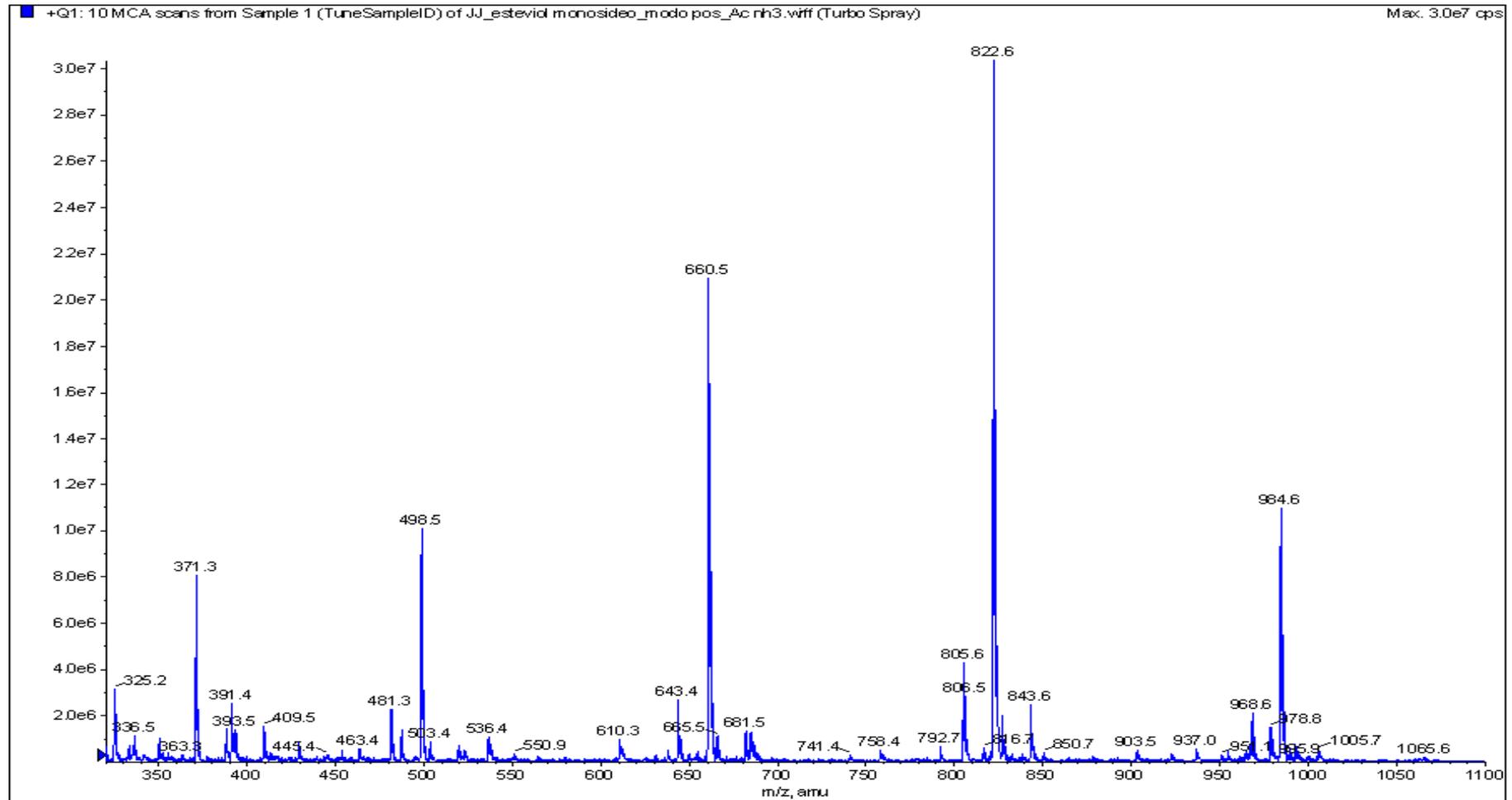


Figura 63 - Espectro de massas do produto obtido da modificação enzimática da Stevita Cristal® (RA): modo negativo

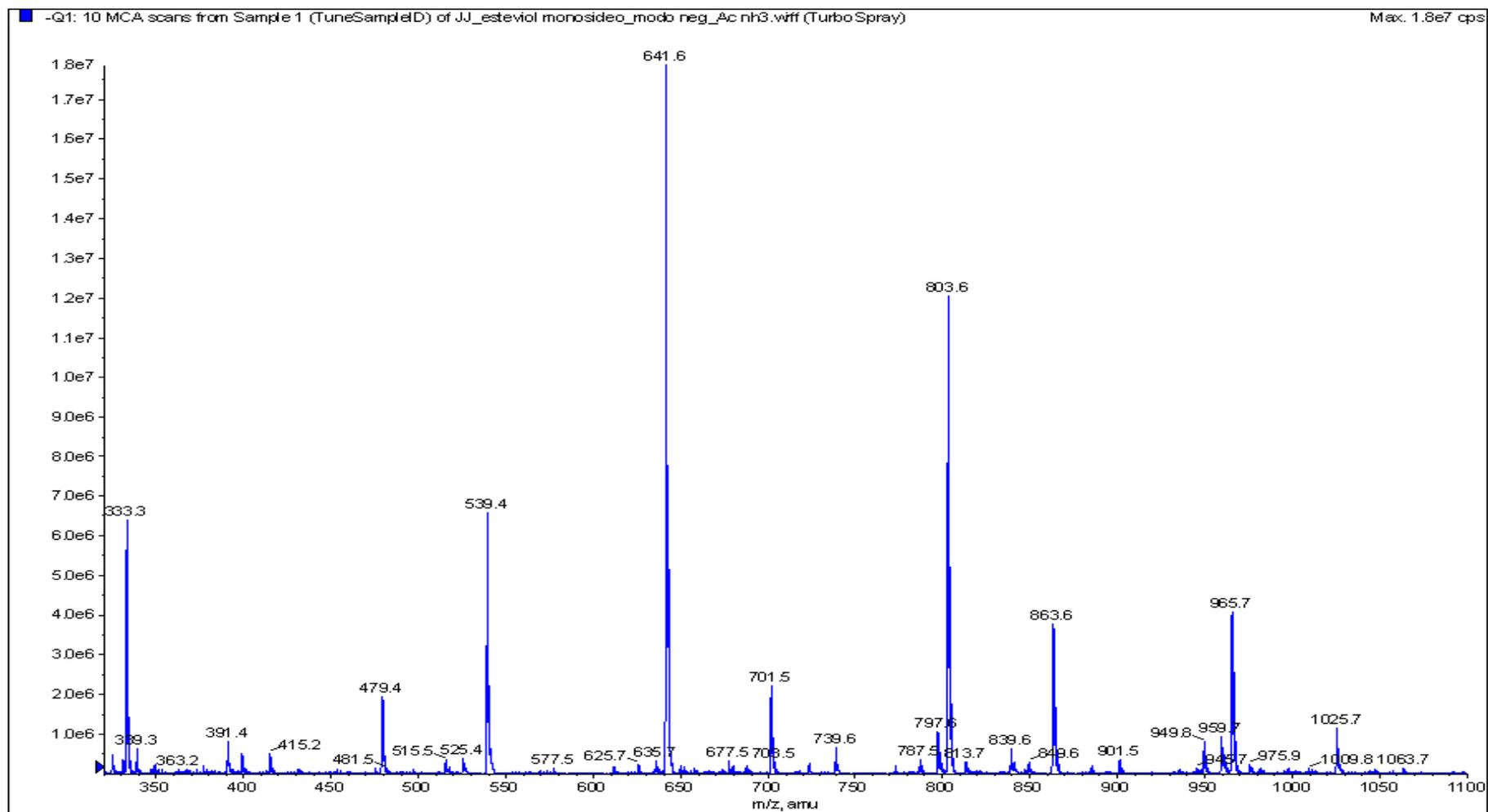


Figura 64 - Espectro de massas do esteviolmonosídeo (MS2)

