

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

MARIA ELISA MELO BRANCO DE ARAÚJO

**BIOSSÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS ACILADOS DE
FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE SUA
BIOATIVIDADE**

Bragança Paulista

2016

MARIA ELISA MELO BRANCO DE ARAÚJO – R.A. 001201202819

**BIOSSÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS ACILADOS DE
FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE SUA
BIOATIVIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Farmacologia

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

Bragança Paulista

2016

QV 325 Araújo, Maria Elisa Melo Branco de.
A69b Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação *in vitro* de sua bioatividade / Maria Elisa Melo Branco de Araújo. -- Bragança Paulista, 2016.
117 p.

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

Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Acilação. 2. Lipase. 3. Flavonoides. 4. Antioxidantes.
5. Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais.
I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

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



ARAÚJO, M. B., Maria Elisa, "Estudo de Biossíntese de Novos Derivados Acilados de Flavonoides e Avaliação In Vitro de sua Bioatividade" Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 03 de Agosto de 2016 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Viviane Cristina Heinzen da Silva
Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Profa. Dra. Raquel de Cassia Santos
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Juliana Aparecida Preto de Godoy
Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

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

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

À Prof.^a Dr.^a Alexandra Frankland Sawaya (Instituto de Biologia – Unicamp); ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - Unicamp), em especial à Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte.

À Prof.^a Dr.^a Heloisa Helena de Araújo Ferreira da Faculdade São Leopoldo Mandic.

À colega de pesquisa Yollanda Moreira Franco, pela amizade e pelo auxílio nos experimentos.

À colega de pesquisa Marcia Cristina Fernandes Messias, pela prestatividade e pelo auxílio no laboratório.

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

À minha mãe, Maria de Fátima Aparecida de Melo, pelo amor e pelo apoio.

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

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

RESUMO

Flavonoides são compostos amplamente distribuídos na natureza que possuem diversas atividades biológicas relatadas *in vitro* e *in vivo*, como atividade antioxidante, antiproliferativa, antimicrobiana e modulação enzimática. A natureza moderadamente hidrofílica dos flavonoides glicosilados dificulta a acessibilidade aos sítios celulares de danos oxidativos e restringe sua aplicação em meios lipofílicos. O objetivo do trabalho foi biossintetizar derivados acilados de flavonoides com atividade biológica relevante, a partir da hesperidina, da naringina e da rutina. Foram utilizadas reações de acilação com diferentes ácidos graxos (6C – 18C), utilizando como biocatalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CALB). A biossíntese do decanoato de hesperidina foi otimizada por delineamento experimental associado à metodologia de superfície de resposta utilizando as variáveis razão entre os substratos, composição do meio reacional e concentração de enzima. A influência da estrutura do flavonoide e do comprimento da cadeia do doador acila nas taxas de conversão foi avaliada, assim como a termoestabilidade da CALB e a lipofilicidade dos derivados acilados biossintetizados (coeficiente de partição). A bioatividade *in vitro* dos derivados de flavonoides foi avaliada considerando as atividades antioxidante (método do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila - DPPH), antimicrobiana (concentração inibitória mínima - MIC), antiproliferativa (método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium - MTT em cultura de células) e a modulação das enzimas xantina oxidase, mieloperoxidase e lipase pancreática porcina. A quantificação dos compostos, realizada por cromatografia líquida de pressão ultra elevada acoplada a espectrometria de massa (UHPLC-MS), mostrou um rendimento entre 20 a 50% na síntese dos derivados acilados. As maiores taxas de acilação foram obtidas com a hesperidina utilizando ácidos graxos de cadeia entre 6C e 10C, seguida da rutina e da naringina. Os derivados acilados exibiram coeficientes de partição (0,95, 0,83 e 0,86 para decanoato de rutina, decanoato de hesperidina e decanoato de naringina, respectivamente) superiores aos dos flavonoides de origem, demonstrando um aumento da lipofilicidade que pode melhorar sua biodisponibilidade e facilitar sua aplicação tecnológica. A acilação aumentou a atividade de neutralização de radicais DPPH da hesperidina e da rutina em cerca de 10%. O octanoato de naringina, o decanoato de naringina e o decanoato de hesperidina mostraram atividade de inibição da xantina oxidase até 50% superior à dos flavonoides padrão. A análise da cinética de inibição mostrou que os compostos são inibidores reversíveis competitivos da xantina oxidase. Não foi observada atividade antiproliferativa, antimicrobiana ou inibição da mieloperoxidase pelos flavonoides e seus derivados. A acilação também não foi capaz de aumentar a atividade de inibição da lipase pancreática dos flavonoides. Os resultados evidenciaram que a acilação enzimática é uma ferramenta de interesse para a melhora da atividade antioxidante dos flavonoides relacionada à neutralização de radicais e à inibição da xantina oxidase.

Palavras-chave: acilação. lipase. flavonoides. antioxidantes. ensaios de seleção de medicamentos antitumorais.

ABSTRACT

Flavonoids are compounds widely distributed in nature that have several biological activities reported *in vitro* and *in vivo*, such as antioxidant, antiproliferative, antimicrobial and enzymatic modulation. The moderately hydrophilic nature of glycosylated flavonoid hinders the accessibility to cellular sites of oxidative damage, in addition to restricting their application in lipophilic media. The aim of the work was to biosynthesize acylated derivatives of flavonoids with relevant biological activity, from hesperidin, naringin and rutin. Acylation reactions with different fatty acids (6C - 18C) were used, using lipase B from *Candida antarctica* (CALB) as a biocatalyst. Biosynthesis of hesperidin decanoate was optimized by experimental design associated with response surface methodology using the variables ratio between the substrates, reaction medium composition and enzyme concentration. The influence of the flavonoid structure and length of the acyl chain donor in the conversion rate was also evaluated, as well as the thermostability of CALB and the lipophilicity of the acylated derivatives biosynthesized (partition coefficient). The *in vitro* bioactivity of flavonoid derivatives was evaluated considering the antioxidant activity (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical method - DPPH), the antimicrobial activity (Minimum Inhibitory Concentration - MIC), the antiproliferative activity (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT method in cell culture) and modulation of the enzymes xanthine oxidase, myeloperoxidase and porcine pancreatic lipase. The quantification of the compounds by Ultra High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (UHPLC-MS) showed a yield between 20 and 50% in the synthesis of acylated derivatives. The highest acylation rates were obtained with hesperidin using chain fatty acids between 6C and 10C, followed by rutin and naringin. The acylated derivatives exhibit partition coefficients (0.95, 0.83 and 0.86 for rutin decanoate, hesperidin decanoate and naringin decanoate, respectively) higher than the source flavonoids, showing an increased lipophilicity that can improve its bioavailability and facilitate their technological application. Acylation increased radical DPPH neutralizing activity of hesperidin and rutin by 10%. Naringin octanoate, naringin decanoate and hesperidin decanoate showed inhibition of xanthine oxidase activity 50% higher than the standard flavonoids. Inhibition kinetics analysis showed that the compounds are competitive reversible inhibitors of xanthine oxidase. There was no antiproliferative activity, antimicrobial activity or inhibition of myeloperoxidase by flavonoids and their derivatives. The acylation was also not able to increase the activity of pancreatic lipase inhibition of flavonoids. The results showed that the enzymatic acylation is a tool of interest for the improvement of the antioxidant activity of flavonoids related to radical scavenging and inhibition of xanthine oxidase.

Keywords: acylation. lipase. flavonoids. antioxidants. drug screening assays, antitumor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	atividade antioxidante total
Abs _{am}	absorbância do controle
Abs _c	absorbância da amostra
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)
AG	ácido graxo
ANOVA	análise de variância
CALB	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
COSMO-RS	" <i>Conductor-like Screening Model for Real Solvents</i> "
DCCR	design central composto rotacional
DHA	ácido docosahexaenoico
DI	densidade de inoculação
DMSO	dimetil sulfóxido
DO	densidade ótica
DPPH	radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila
EPA	ácido eicosapentaenoico
ERK	quinases reguladas por sinais extracelulares (" <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> ")
ERRO	espécie reativa de oxigênio
FRAP	poder antioxidante de redução do ferro (" <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ")
H ⁺	íon hidrogênio
HO [•]	radical hidroxila
HTAB	brometo de hexa trimetil amônio
IC ₅₀	concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular ou da atividade enzimática
K _m	constante de Michaelis-Menten
LDL	lipoproteína de baixa densidade (" <i>Low Density Lipoprotein</i> ")
MBC	concentração bactericida mínima (" <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> ")
MIC	concentração inibitória mínima (" <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ")
MPO	mieloperoxidase
MSR	metodologia de superfície de resposta

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium
NO•	radical óxido nítrico
Nrf2	fator nuclear eritroide (<i>“Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2”</i>)
O ₂ ⁻	íon superóxido
OH	grupo hidroxila
ORAC	capacidade de absorbância do radical oxigênio (<i>“Oxygen Radical Absorbance Capacity”</i>)
ρ-NPP	ρ-nitrofenil palmitato
RMN 13C	ressonância magnética nuclear do carbono 13
RO•	radical alcóxila
ROO•	radical peróxila
SFB	soro fetal bovino
TCA	ácido tricloroacético
UHPLC-MS	cromatografia líquida de pressão ultra elevada acoplada a espectrometria de massa (<i>“Ultra-High Pressure Liquid Chromatography – Mass Spectrometry”</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (<i>“Vascular Endothelial Growth Factor”</i>)
V _{máx}	velocidade máxima
XO	xantina oxidase
XOI	inibição da xantina oxidase (<i>“Xanthine Oxidase Inhibition”</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da estrutura de um flavonoide.	3
Figura 2	Principais subclasses de flavonoides. A divisão é baseada em variações no anel heterocíclico C.	4
Figura 3	Estruturas químicas das flavanonas naringina (A) e hesperidina (B)	5
Figura 4	Estrutura química da rutina, um flavonol glicosídico.	6
Figura 5	Reações catalisadas por lipases.	9
Figura 6	Potenciais sítios de esterificação em reações de acilação catalisadas por lipases.	12
Figura 7	Acilação da rutina com ácido láurico catalisada pela lipase CALB.	16
Figura 8	Exemplos de cátions e ânions em líquidos iônicos.	17
Figura 9	Termoestabilidade da CALB após 6, 12 e 24 h de incubação em acetona. Dados representados como média \pm desvio padrão de ensaios em triplicata.	28
Figura 10	Progresso da biossíntese de derivados acilados da hesperidina (100 mM) com ácido decanoico (500 mM) catalisada pela lipase CALB (8,0 mg/mL em meio composto por [bmim]BF ₄ e acetona (5:5, v/v) a 50 °C.	29
Figura 11	Superfície de resposta para a biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela CALB (11,6 mg/mL) a 50°C por 96 h, como função da razão molar hesperidina/ácido decanoico e da razão [bmim][BF ₄]/acetona.	33
Figura 12	Superfície de resposta para a biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela CALB (11,6 mg/mL) a 50°C por 96 h, como função da razão molar hesperidina/ácido decanoico e da concentração de CALB. A razão [bmim][BF ₄]/acetona foi fixada em 8:2 (v/v).	33
Figura 13	Superfície de resposta para a biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela CALB (11,6 mg/mL) a 50°C por 96 h, como função da razão [bmim][BF ₄]/acetona e da concentração de CALB. A razão molar hesperidina/ácido decanoico foi fixada em 1:7.	34
Figura 14	Rotas de formação das espécies reativas de oxigênio.	43
Figura 15	Requisitos responsáveis pela atividade de neutralização de radicais dos flavonoides. (A) ligação dupla 2,3 conjugada com a função 4-oxo no anel B; (B) grupo orto-dihidroxi (catecol) no anel B; (C) grupos OH nas posições 3'' e 5'' do anel A.	44
Figura 16	Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO). (A) ciclo peroxidásico clássico; (B) reação do grupo heme com O ₂ ; (C) ligação do NO [•] /modulação da atividade.	54

Figura 17	Atividade antioxidante (sequestro de radicais DPPH, %) de soluções a 0,75 mg/mL de naringina padrão (A), de seus derivados acilados hexanoato de naringina (B), octanoato de naringina (C) e decanoato de naringina (D), da hesperidina padrão (E), de seus derivados acilados hexanoato de hesperidina (F), octanoato de hesperidina (G) e decanoato de hesperidina (H), da rutina padrão (I), de seus derivados acilados hexanoato de rutina (J), octanoato de rutina (K) e do padrão de ácido ascórbico (L). * p < 0,05 ** p < 0,01, *** p < 0,001 em comparação com o flavonoide padrão de cada grupo.	63
Figura 18	Efeito dos flavonoides e derivados acilados (45 µM) na atividade na inibição da enzima xantina oxidase (concentração de substrato de 250µM). A = Naringina, B = Hexanoato de naringina, C = Octanoato de naringina, D = Decanoato de naringina, E = Hesperidina, F = Hexanoato de hesperidina, G = Octanoato de hesperidina, H = Decanoato de hesperidina, I = Rutina, J = Hexanoato de rutina, K = Octanoato de rutina, L = Decanoato de rutina. * p < 0,05, **p<0,01.	70
Figura 19	Perfil cinético de inibição da xantina oxidase pelo octanoato de naringina (45 e 90 µM).	72
Figura 20	Perfil cinético de inibição da xantina oxidase pelo decanoato de naringina (45 e 90 µM).	73
Figura 21	Perfil cinético de inibição da xantina oxidase pelo decanoato de hesperidina (45 e 90 µM).	74
Figura 22	Representação gráfica dos valores da XOI (%) <i>versus</i> concentração dos flavonoides precursores e acilados (µM).	77
Figura 23	Atividade da lipase pancreática porcina, representada pela concentração de p-nitrofenol (µmol) produzida para as amostras de orlistat (inibidor padrão), flavonoides e flavonoides acilados na concentração de 75 µg/mL. Dados representados como média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.	79
Figura 24	Atividade da lipase pancreática porcina, representada pela concentração de p-nitrofenol (µmol) produzida para as amostras de orlistat (inibidor padrão), flavonoides e flavonoides acilados na concentração de 150 µg/mL. Dados representados como média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.	80
Figura 25	Atividade da lipase pancreática porcina, representada pela concentração de p-nitrofenol (µmol) produzida para as amostras de orlistat (inibidor padrão), flavonoides e flavonoides acilados na concentração de 300 µg/mL. Dados representados como média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.	80

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Principais classes de flavonoides encontradas em alimentos	4
Quadro 2	Uso de lipases em reações de acilação de flavonoides	13
Quadro 3	Atividades biológicas de derivados acilados de flavonoides biossintetizados por lipases.	40
Quadro 4	Relatos da literatura sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ricos em flavonoides e flavonoides isolados.	48
Tabela 1	Influência do comprimento da cadeia carbônica e da natureza do doador acila na acilação enzimática de flavonoides	20
Tabela 2	Variáveis e níveis do design central composto rotacional para a acilação enzimática da hesperidina com ácido decanoico catalisada pela lipase CALB.	24
Tabela 3	Valores codificados do design central composto rotacional para a acilação enzimática da hesperidina com ácido decanoico catalisada pela lipase CALB.	25
Tabela 4	Design central composto rotacional e respostas (taxa de conversão, %) para biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela CALB após 96 h de reação.	30
Tabela 5	Coefficientes de regressão do design central composto rotacional para a biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela CALB após 96 h de reação.	31
Tabela 6	ANOVA para o design central composto rotacional após 96 h de reação de biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela CALB.	32
Tabela 7	Massas (<i>m/z</i>) UHPLC-MS dos flavonoides padrão e estimadas para seus derivados acilados com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica.	35
Tabela 8	Porcentagem dos derivados acilados de flavonoides biossintetizados após acilação com ácidos de cadeia carbônicas diferentes catalisada pela CALB.	37
Tabela 9	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos derivados acilados de rutina e naringina após purificação em sistema de solvente hexano/água (4:1, v/v) determinada por UHPLC-MS	38
Tabela 10	Coefficiente de partição (<i>k</i>) em octanol/água dos flavonoides padrão e dos derivados acilados de rutina, hesperidina e naringina obtidos por acilação com ácido decanoico.	39
Tabela 11	Relação entre a estrutura de flavonoides e seu potencial de inibição da xantina oxidase (IC_{50}).	53
Tabela 12	Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.	58

Tabela 13	Atividade antiproliferativa dos flavonoides naringina, rutina e hesperidina e seus derivados acilados determinada pelo método MTT em cultura de células tumorais humanas, após 48 h de incubação, expressa em IC ₅₀ (µg/mL).	65
Tabela 14	Resultados de MIC (Concentração Inibitória Mínima) (mg/mL) das amostras de flavonoides padrão e seus derivados obtidos por acilação enzimática para as linhagens microbianas estudadas.	68
Tabela 15	Parâmetros cinéticos da reação enzimática catalisada pela xantina oxidase na ausência (controle) e em presença de diferentes inibidores (45 e 90µM).	75
Tabela 16	Valores de IC ₅₀ (µM) dos flavonoides precursores e de seus derivados acilados.	75
Tabela 17	Atividade da mieloperoxidase (unidades de MPO, UMPO) do meio RPMI (controle) e das amostras de flavonoides padrão e acilados com ácido decanoico nas concentrações de 2,5 e 5,0 µg/mL.	78

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I – SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DERIVADOS ACILADOS DE FLAVONOIDES	3
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Flavonoides: aspectos gerais e relação estrutura-atividade	3
1.2. Aplicações tecnológicas de flavonoides e seus derivados	6
1.3. Lipases como catalisadores	8
1.4. Biossíntese de derivados acilados de flavonoides com lipases	10
1.4.1. Variáveis que influenciam as reações de acilação de flavonoides	15
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Determinação da atividade e estabilidade da lipase B de <i>Candida antarctica</i>	23
3.2. Otimização da biossíntese de decanoato de hesperidina por metodologia de superfície de resposta	23
3.3. Quantificação dos compostos por UHPLC – MS (cromatografia líquida de pressão ultra elevada acoplada a espectrometria de massa)	25
3.4. Reação de acilação de flavonoides com diferentes ácidos graxos	26
3.5. Purificação dos derivados acilados de flavonoides	26
3.6. Determinação do coeficiente de partição dos derivados acilados de flavonoides em octanol/água	27
3.7. Análise estatística	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Atividade enzimática e termoestabilidade da lipase B de <i>Candida antarctica</i>	28
4.2. Efeito dos parâmetros reacionais e da presença de líquido iônico na síntese de decanoato de hesperidina	29
4.3. Efeito do tipo de flavonoide e do tamanho da cadeia carbônica do ácidos graxos na taxa de conversão	35
4.4. Coeficiente de partição dos derivados acilados de flavonoides em octanol/água	38

CAPÍTULO II – ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS FLAVONOIDES E EFEITO DA ACILAÇÃO	40
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	40
1.1. Efeito da acilação nas atividades biológicas dos flavonoides: aspectos gerais	40
1.2. Atividade antioxidante	43
1.3. Atividade antiproliferativa	45
1.4. Atividade antimicrobiana	47
1.5. Modulação enzimática	52
2. OBJETIVOS	56
2.1. Objetivo geral	56
2.2. Objetivos específicos	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH)	57
3.2. Determinação da atividade antiproliferativa pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT)	58
3.3. Determinação da atividade antimicrobiana	60
3.4. Determinação da atividade de modulação enzimática	60
3.4.1. Atividade da xantina oxidase (XO)	60
3.4.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO)	61
3.4.3. Atividade da lipase pancreática porcina	62
3.5. Análise estatística	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Atividade antioxidante	63
4.2. Atividade antiproliferativa	64
4.3. Atividade antimicrobiana	68
4.4. Modulação enzimática	69
4.4.1. Cinética de inibição da xantina oxidase (XO)	69
4.4.2. Inibição da atividade da mieloperoxidase (MPO)	78
4.4.3. Inibição da atividade da lipase pancreática porcina	79
5. CONCLUSÃO	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
7. APÊNDICES	95

INTRODUÇÃO

Inúmeros ensaios *in vitro* e estudos *in vivo* em animais e humanos têm relatado as atividades biológicas dos flavonoides, relacionadas principalmente à sua atividade antioxidante, na prevenção e/ou combate a doenças crônico-degenerativas e como agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos e moduladores da atividade de enzimas (DANIHELOVA; VISKUPICOVA; STURDIK, 2012).

Para produzir o efeito biológico *in vivo*, é essencial que suficiente quantidade do composto alcance os alvos celulares, o que depende de sua bioacessibilidade, que pode ser definida como a quantidade ou fração do composto que é liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal e se torna disponível para absorção (HEANEY, 2001), e de sua biodisponibilidade, que é a fração do nutriente ou composto que alcança a circulação sistêmica e é utilizada pelos tecidos-alvo (WOOD, 2005). A baixa absorção *in vivo* dos flavonoides, encontrados em fontes naturais principalmente na forma glicosilada, é um fator limitante para sua biodisponibilidade (THILAKARATHNA e RUPASINGHE, 2013). Outro fator responsável pela baixa biodisponibilidade de um composto refere-se a limitações na distribuição do mesmo, o que está diretamente relacionado às suas características físico-químicas como, por exemplo, sua lipofilicidade, que controla a sua capacidade de alcançar o verdadeiro local de ação de radicais livres, influenciando sua interação com células, proteínas e enzimas (MASSAELI; SOBRATTEE; PIERCE, 1999). A baixa solubilidade em sistemas lipofílicos também limita a aplicação dos flavonoides em vários campos da indústria (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; STURDIK, 2009).

A acilação biocatalítica de flavonoides utilizando enzimas tem sido considerada uma estratégia eficaz e promissora, uma vez que, além de melhorar a biodisponibilidade e as propriedades físico-químicas dos compostos, é capaz também de melhorar algumas de suas atividades biológicas (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; STURDIK, 2009).

Baseado no exposto, o presente estudo teve por interesse biossintetizar derivados de flavonoides utilizando reações de acilação catalisadas por lipase, visando obter compostos com maior lipofilicidade e atividades biológicas superiores em relação às moléculas de origem. Os processos enzimáticos para modificação de moléculas são de grande interesse, em especial devido à seletividade (ARDHAOUI et al., 2004b), às condições brandas de reação e ao menor número de etapas requeridas, em relação aos métodos químicos clássicos (KYRIAKOU et al., 2012).

Para facilitar a compreensão, o trabalho foi dividido em dois capítulos (I e II) considerando os experimentos relacionados aos processos biocatalíticos (Capítulo I) e de avaliação de atividade biológica dos novos derivados de flavonoides biossintetizados (Capítulo II).

O Capítulo I consiste em um estudo da reação de acilação dos flavonoides hesperidina, naringina, rutina e quercetina, catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (CALB), utilizando como doadores acila ácidos graxos (AGs) com diferentes comprimentos de cadeia (6C – 18C). Foram utilizados os flavonoides mais abundantes na natureza e também de menor custo. Foi feito um estudo da influência da estrutura do substrato flavonoide (aglicona ou glicosilado) e do agente acilante, da enzima e do meio reacional, que são variáveis a ter em consideração na acilação enzimática. A otimização da acilação da hesperidina com ácido decanoico, catalisada pela CALB, foi realizada utilizando metodologia de superfície de resposta (MSR), e os principais fatores que, segundo relatos da literatura, influenciam a reação de acilação enzimática foram investigados: razão molar em massa hesperidina/ácido decanoico; composição do meio reacional, representada pela razão entre líquido iônico e solvente orgânico (razão [bmim][BF₄]/acetona) e concentração de lipase. O método empregado permitiu estabelecer os efeitos de cada fator e também as interações entre os fatores que influenciam nas taxas de acilação. O Capítulo I descreve também a determinação da lipofilicidade (coeficiente de partição) e a purificação em sistema de solvente hexano/água (4:1, v/v) que permitiu a recuperação eficaz dos derivados acilados a partir do meio reacional.

O Capítulo II descreve a influência da reação de acilação nas atividades biológicas *in vitro* dos flavonoides, entre elas: atividade antioxidante, avaliada pelo método de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH); atividade antiproliferativa em cultura de células, avaliada pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT); atividade antimicrobiana, avaliada através de ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) nas linhagens *Candida albicans* (ATCC 10231), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e atividade de modulação de enzimas envolvidas em processos oxidativos (xantina oxidase, incluindo um estudo da cinética de inibição desta enzima), inflamatórios (mieloperoxidase) e na obesidade (lipase pancreática). Desta forma, o Capítulo II apresenta um panorama geral sobre possíveis aspectos de interesse na síntese de derivados acilados para aplicações industriais e terapêuticas.

CAPÍTULO I – BIOSÍNTESE ENZIMÁTICA DE DERIVADOS ACILADOS DE FLAVONOIDES

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Flavonoides: aspectos gerais e relação estrutura-atividade

Os flavonoides compõem uma classe de compostos fenólicos amplamente distribuída em frutas, hortaliças, legumes, grãos, cereais e leguminosas. Até o ano de 2008, mais de 8000 flavonoides diferentes haviam sido isolados a partir das suas fontes naturais (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008).

A estrutura dos flavonoides (Figura 1) está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou pró-antocianinas ou catequinas) e as antocianidinas, denominado de núcleo flavana. Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonoide (AHERNE e O'BRIEN, 2002). Variações no anel heterocíclico C originam as diversas classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (Quadro 1 e Figura 2). Além disso, a estrutura básica dos flavonoides origina vários padrões de substituição nos anéis benzênicos A e B dentro das classes dos flavonoides: hidroxilas fenólicas, O-açúcares, grupos metóxi, sulfatos e glucoronídeos (HOLLMAN e KATAN, 1999).

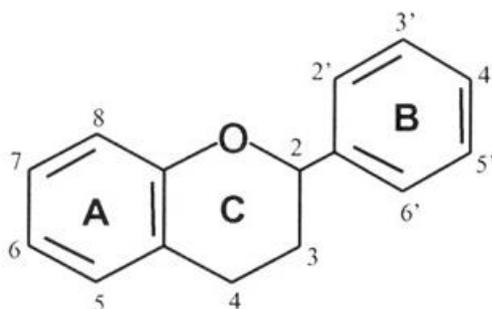
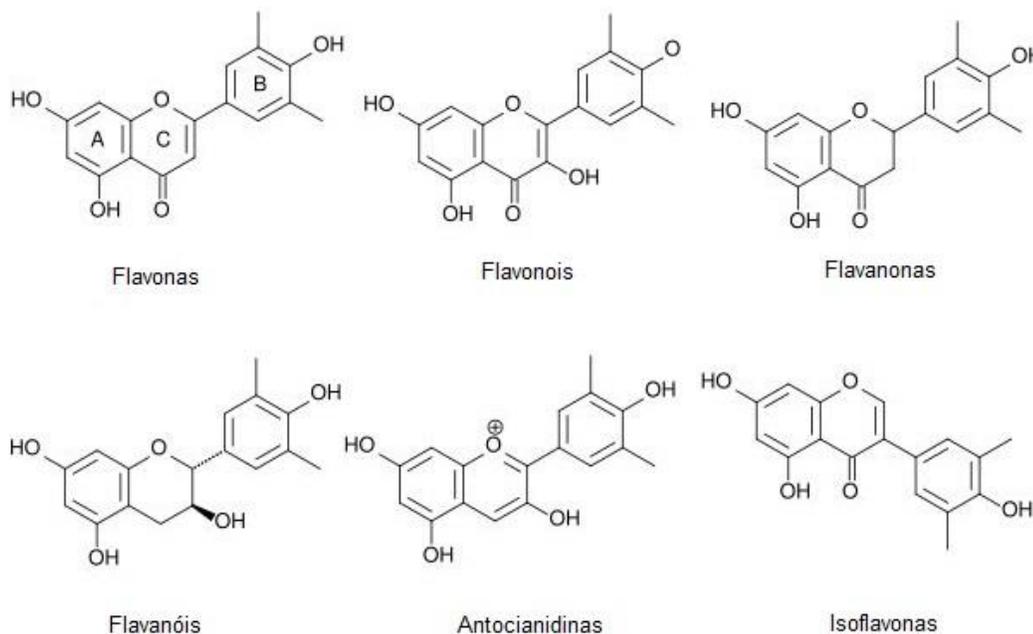


FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura de um flavonoide (adaptado de SANTOS-BUELGA e WILLIAMSON, 2003)

QUADRO 1. Principais classes de flavonoides encontradas em alimentos

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

OH = grupamento hidroxila; C=O = grupamento carbonila

**FIGURA 2.** Principais subclasses de flavonoides. A divisão é baseada em variações no anel heterocíclico C (adaptado de HOLLMAN e KATAN, 1999).

A estrutura química dos flavonoides pode variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações. Flavonoides e isoflavonoides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos. Exceto o grupo das leucoantocianinas, os demais flavonoides ocorrem em plantas sempre

acompanhados por glicídios recebendo assim, a denominação de *glico-flavonoides* ou *flavonoides glicosilados*. As substituições glicídicas incluem D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose, lignina e arabinose (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001). Quando se apresenta isenta de glicídios, a estrutura recebe o nome de *aglicona*. O resíduo de açúcar da molécula do flavonoide é provavelmente o principal fator determinante de sua absorção pelo organismo (NIELSEN et al., 2006).

As flavanonas são uma classe de flavonoides característica de frutas cítricas. Possuem anel C saturado e geralmente ocorrem naturalmente como glicosídeos, tais como rutinosídeos (6-O- α -L-ramnosil-D-glicosídeos) e neohesperidosídeos (2-O- α -L-ramnosil-D-glicosídeos) ligados na posição 7 (Figura 3). A laranja doce (*Citrus sinensis*) é abundante em rutinosídeos (principalmente hesperidina), enquanto a laranja azeda (*Citrus aurantium*) possui principalmente neohesperidosídeos, como a naringina. Os neohesperidosídeos são intensamente amargos, sendo responsáveis pelo sabor característico da laranja azeda.

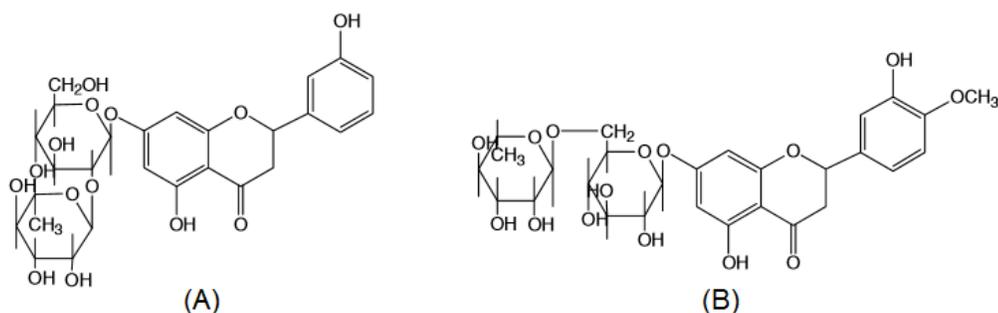


FIGURA 3. Estruturas químicas das flavanonas naringina (A) e hesperidina (B) (WU; GUAN; YE, 2007)

A hesperidina e sua forma aglicona, a hesperetina, possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias relatadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, relacionadas não somente à sua atividade de neutralização de radicais, mas também à sua capacidade de modular as defesas antioxidantes das células pela via de sinalização ERK (quinases reguladas por sinais extracelulares)/Nrf2 (fator nuclear eritroide) (PARHIZ et al., 2014).

Estudos mostram que flavanonas podem proteger contra a carcinogênese quimicamente induzida *in vitro*, em baixas concentrações (VALLEJO et al., 2010), e reduzir a incidência e a multiplicidade de adenomas e adenocarcinomas de cólon, além de inibir o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes *in vivo* (LAI et al., 2013).

A rutina (quercetina-3-ramnosil-glicosídeo) (Figura 4) pertence à classe dos flavonóis e é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e vasoativas, assim como por sua capacidade de diminuir a permeabilidade capilar e de reduzir o risco de aterosclerose, diminuindo assim a incidência de doenças coronarianas, possivelmente pela diminuição da agregação plaquetária (LA CASA et al., 2000; JIANG et al., 2007).

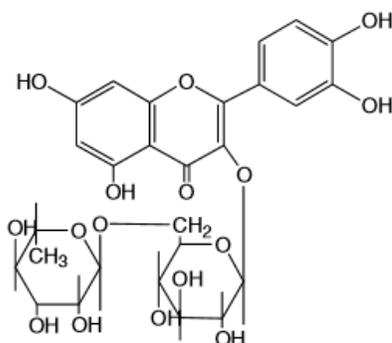


FIGURA 4. Estrutura química da rutina, um flavonol glicosídico (WU; GUAN; YE, 2007).

A rutina possui uma ampla gama de propriedades farmacológicas, em geral relacionadas à sua atividade antioxidante, empregadas na medicina e na nutrição humana. Convencionalmente, a rutina é utilizada como agente antimicrobiano, antifúngico e antialérgico (AL-DHABI et al., 2015). Pesquisas recentes tem demonstrado os benefícios farmacológicos da rutina no tratamento de doenças crônicas como câncer, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia (SHARMA et al., 2013).

Estudos demonstram uma resposta dose-dependente na inibição da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (JIANG et al., 2007), e a atividade antioxidante da rutina na reação de Fenton (CAILET et al., 2007). Essas propriedades são potencialmente benéficas na prevenção de doenças e também na manutenção da estabilidade do genoma.

1.2. Aplicações tecnológicas de flavonoides e seus derivados

Na área da cosmetologia, a prevenção e o atenuamento do envelhecimento cutâneo é preocupação constante, por meio da busca e do estudo de compostos antioxidantes eficazes, oferecidos em produtos cosméticos aos consumidores (MAGALHÃES, 2000). Existe uma busca por formas alternativas de promover fotoproteção efetiva aos pacientes e consumidores,

principalmente contra neoplasias cutâneas induzidas pela radiação ultravioleta. O desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante do organismo é uma das maiores causas do envelhecimento cutâneo, podendo levar ao surgimento de doenças na pele, resultado das condições causadas por esse desequilíbrio e que são conseqüências de danos a estruturas da pele, como lipídios, proteínas e DNA. As radiações UVA e UVB estimulam a formação de radicais livres, e o estresse oxidativo provocado por elas nas camadas da pele depende da penetração dos raios (MAGALHÃES, 2000).

Os extratos vegetais são amplamente investigados por sua ação antioxidante e sua aplicação industrial é objeto de interesse crescente. A abundância de substâncias antioxidantes nos vegetais é atribuída ao processo evolutivo destas espécies como proteção natural contra os radicais livres formados pela radiação UV.

Em modelos animais e em cultura de células, diversos extratos vegetais comprovadamente neutralizam a reatividade radicalar, diminuem lesões celulares e danos a proteínas, lipídeos e AGs. O chá verde ou preto extraído da espécie *Camellia sinensis* constitui um extrato vegetal rico em antioxidantes. Sua composição pode variar de acordo com as condições de plantio, localidade e variedade do cultivar, mas de maneira geral o extrato de *Camellia sinensis* apresenta catequinas (epigallocatequina, epigallocatequina galato, epicatequina galato e galocatequina), quercetina, kaempferol e miricetina (F'GUYER, AFAK; MUKHTAR, 2003). Após administração oral de chá verde, ratos submetidos à radiação UV demonstraram redução dos danos oxidativos e menor indução de metaloproteinases, prevenindo danos oxidativos provocados pela radiação UV (VAYALIL et al., 2004).

Muitas espécies vegetais possuem atividade comprovada cientificamente e são usadas na terapêutica, entre elas *Ginkgo biloba*, trevo vermelho (*Trifolium pratense*), alho (*Allium sativum*) e cardo-mariano (*Silybum marianum*) (F'GUYER, AFAK; MUKHTAR, 2003). No entanto, a maior parte dos flavonoides em fontes naturais se apresenta na forma glicosilada e, portanto, sua aplicação em determinados campos é limitada, devido a sua baixa solubilidade em sistemas lipofílicos (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; STURDIK, 2009).

Uma solução para aumentar a natureza hidrofóbica (lipofilização) de flavonoides é a reação de acilação utilizando moléculas alifáticas ou aromáticas. A reação de acilação de flavonoides pode ser feita química ou enzimaticamente, sendo o método enzimático mais seletivo (ARDHAOUI et al., 2004b), além de ocorrer em condições brandas de reação (pH próximo ao neutro, temperatura próxima à ambiente e pressão atmosférica) e evitar as várias etapas de proteção/desproteção requeridas em métodos químicos clássicos, necessárias

devido à presença de vários grupos hidroxila (OH) reativos na estrutura do flavonoide (KYRIAKOU et al., 2012).

Para a acilação *in vitro* de flavonoides, uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas tem sido testada. Estas incluem lipases, transferases, isomerases, esterases e proteases. As lipases estão entre os biocatalisadores mais eficazes e mais estudados nas reações de acilação de flavonoides.

1.3. Lipases como catalisadores

Lipases ou triacilglicerolhidrolases (E.C 3.1.1.3) são um tipo de carbóxi-esterase pertencente à classe das serinas hidrolases, que representa a família de enzimas que compreende as lipases, esterases, proteases e amilases. São solúveis em água e não necessitam de cofatores. Possuem peso molecular entre 20 a 75 kDa e apresentam atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. São encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos classificados como *Generally Regarded as Safe*, ou seja, não nocivos à saúde humana. A facilidade de produção e o número ilimitado de microrganismos produtores, além do amplo potencial em aplicações industriais, fazem com que o interesse na obtenção de lipases microbianas tenha crescido consideravelmente nas últimas décadas.

Em condições naturais, as lipases catalisam a hidrólise de ligações éster na interface hidrofílica-hidrofóbica. Nesta interface, as lipases exibem um fenômeno chamado de ativação interfacial, que causa um aumento considerável na atividade enzimática quando em contato com uma superfície hidrofóbica. O processo catalítico envolve uma série de estágios diferenciados: contato com a interface, mudança conformacional, penetração na interface e, finalmente, a catálise propriamente dita (HIDALGO e BORNSCHEUER, 2006). Sob certas condições, especialmente na ausência de água, as lipases são capazes de reverter a reação, o que leva à esterificação com formação de glicerídeos a partir de AGs e glicerol. Essa atividade de síntese tem sido empregada com sucesso para a modificação estrutural de flavonoides com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas e suas atividades biológicas.

Genericamente, a reação de interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um álcool (alcoólise), um éster e um ácido (acidólise), um ácido graxo e uma amina para

síntese de amidas (aminólise) ou ainda de um éster e outro éster, na forma de glicerídeos ou de monoéster, reação intitulada por alguns autores de transesterificação. A Figura 5 sumariza as reações catalisadas por lipases.

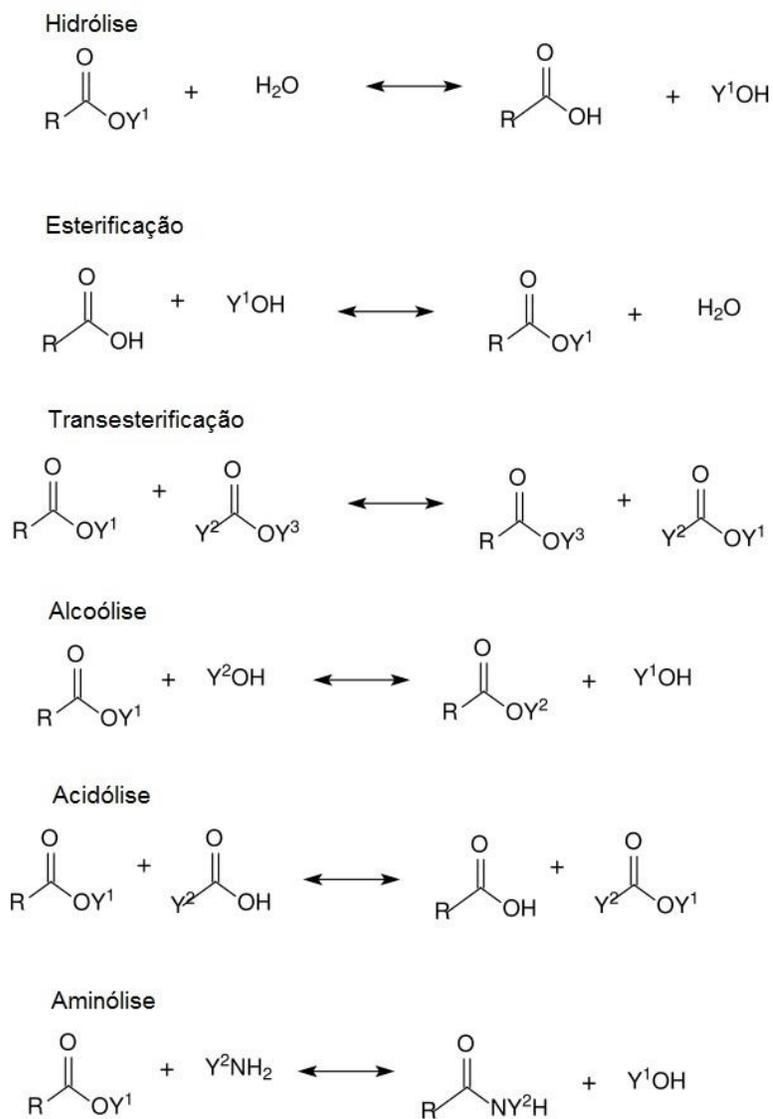


FIGURA 5. Reações catalisadas por lipases (adaptado de PAQUES e MACEDO, 2006)

1.4. Biossíntese de derivados acilados de flavonoides com lipases

A acilação de flavonoides utilizando moléculas alifáticas ou aromáticas, como AGs e seus ésteres, além de levar ao aumento da lipofilicidade dos compostos, também confere características benéficas à molécula original, melhorando suas propriedades farmacológicas (KATSOURA et al., 2006; MELLOU et al., 2006). Estudos revelam que a proteção dos grupos funcionais OH de flavonoides através de O-metilação ou O-acetilação resulta em análogos com maior absorção intestinal, resistência ao metabolismo hepático e melhor atividade anticancerígena em relação aos compostos originais (KYRIAKOU et al., 2012), sendo essa proteção, portanto, altamente desejável.

Em vegetais, a acilação de flavonoides ocorre de forma natural através da ação de diversas aciltransferases, responsáveis pela transferência de grupos acila alifáticos ou aromáticos de uma molécula CoA-doadora para grupos OH de resíduos glicosídicos de flavonoides (DAVIES e SCHWINN, 2006). Essas modificações estruturais modulam a atividade fisiológica do flavonoide através de alterações em sua solubilidade, estabilidade, reatividade e interação com alvos celulares (FERRER et al., 2008).

Para biossíntese *in vitro* de derivados acilados de flavonoides, entretanto, o uso de aciltransferases como biocatalisadores apresenta inconvenientes, devido à necessidade da presença da acil-coenzima A correspondente, que deve ser usada em quantidades estequiométricas ou ser regenerada *in situ*. Assim, enzimas hidrolíticas (lipases, esterases e proteases) passaram a ser reconhecidas como substitutos eficazes para esses catalisadores, devido a sua ampla disponibilidade, baixo custo, quimio-, regio- e enantiosseletividade, condições brandas de reação e ausência de necessidade de cofatores (COLLINS e KENNEDY, 1999). O uso destes biocatalisadores também evita as várias etapas requeridas em métodos químicos clássicos, que se devem ao grande número de grupos OH reativos presentes nos polifenóis (KYRIAKOU et al., 2012).

Diversos tipos de lipase são capazes de catalisar a acilação de flavonoides glicosilados; já a acilação de formas agliconas é realizada somente pelas lipases de *Pseudomonas cepacia* (CHEBIL et al., 2006).

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é um excelente biocatalisador com alta enantiosseletividade e regiosseletividade em uma ampla gama de substratos, aceitando uma ampla gama de substratos e apresentando tolerância média a meios não-aquosos, além de resistência à inativação térmica (DEGN et al., 1999). A CALB é o biocatalisador mais estudado

em reações de acilação de flavonoides, sendo capaz de acilar flavonoides glicosilados e possuindo pequena atividade para álcoois terciários e polifenóis agliconas, mas nenhuma atividade detectável para flavonoides agliconas. Um único estudo relatando a acilação de flavonoides agliconas por lipase CALB está disponível na literatura (KYRIAKOU et al., 2012). A CALB pertence à superfamília das α/β hidrolases, possui 317 resíduos de aminoácidos e conserva uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina (Ser105-His224-Asp187) (LUTZ, 2004).

De Oliveira et al. (2009) estudaram a regioseletividade da CALB na acilação da rutina e da isoquercetina através de modelagem molecular, reportando que a porção aglicona dos flavonoides se estabiliza na entrada do sítio de ligação da enzima através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, localizando-se o resíduo glicosídico dos flavonoides próximo ao centro do sítio. Os autores reportaram que apenas a OH 6'' primária da glicose da isoquercetina e a OH 4'' secundária da ramnose da rutina são aciladas, pois estas se estabilizam próximas aos sítios catalíticos. A Figura 6 ilustra os potenciais sítios de esterificação em reações de acilação catalisadas por lipases.

O Quadro 2 sintetiza alguns trabalhos encontrados na literatura sobre a acilação de flavonoides utilizando lipases.

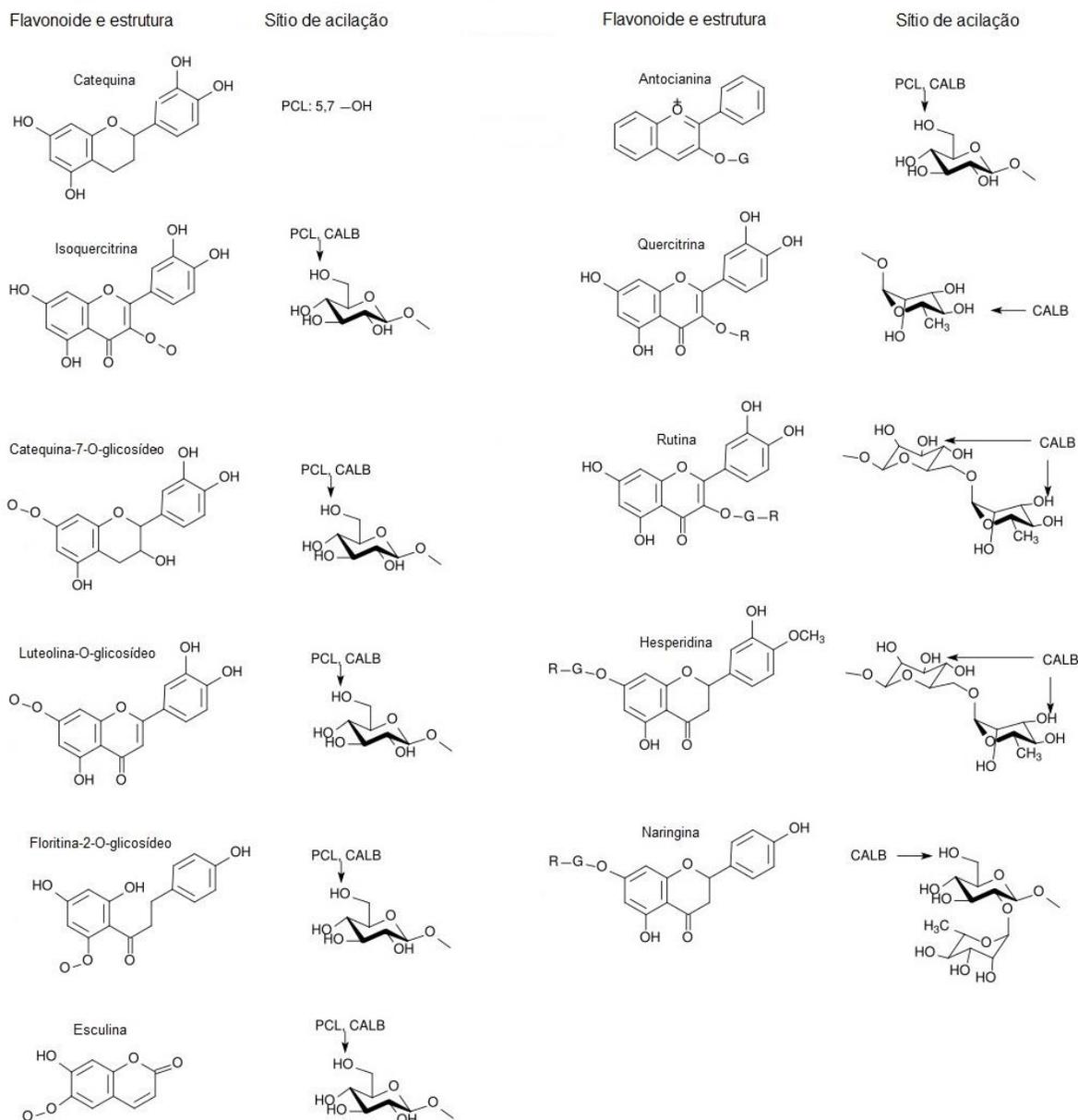


FIGURA 6. Potenciais sítios de esterificação em reações de acilação catalisadas por lipases (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; STURDIK, 2009).

QUADRO 2. Uso de lipases em reações de acilação de flavonoides.

Continua

Flavonoide	Lipase	Doador Acila	Meio Reacional	Referência
naringina	<i>C. antarctica</i> B	ácido ricinoleico, óleo de rícino	acetone	ALMEIDA et al., 2012
rutina, esculina	<i>C. antarctica</i> B	AG (láurico, mirístico, palmítico, esteárico, adípico, azelaico, dodecandióico, hexadecandióico, 11-aminoundecanoico e 11-mercaptoundecanoico)	álcool terc-amílico	ARDHAOUI et al., 2004a
quercetina, hesperidina, rutina, esculina	<i>C. antarctica</i> B	AG (C6:0, C7:0, C9:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1)	2-metil-2-butanol	ARDHAOUI et al., 2004b
naringina, prunina	<i>C. antarctica</i> B <i>Rhizomucor miehei</i>	laurato de vinila	acetona acetonitrila tetrahidrofurano terc-butanol	CÉLIZ e DAZ, 2011
prunina	<i>C. antarctica</i> B	laurato de vinila	acetone	CÉLIZ et al., 2012
floridzina	<i>C. antarctica</i> B	ésteres etílicos de ácido cinâmico	ésteres etílicos de ácido cinâmico, benzoato de metila, salicilato de metila	ENAUD et al., 2004
naringina, rutina	<i>C. antarctica</i> , <i>T. lanuginosus</i> e <i>R. miehei</i>	AG (oleico), ésteres vinílicos de AG (butirato de vinila, laurato de vinila)	líquidos iônicos ([bmim]BF ₄ e [bmim]PF ₆), acetona	KATSOURA et al., 2006
salicina, helicina, esculina, naringina	<i>C. antarctica</i> B	butirato de vinila	acetona ou líquido iônico ([bmim]BF ₄ e/ou [bmim]PF ₆)	KATSOURA et al., 2007
naringina, rutina	<i>C. antarctica</i> B	AG e seus ésteres (8C-12C)	acetona, terc-butanol, tetrahidrofurano	KONTOGIANNI et al., 2003
quercetina, naringenina	<i>C. antarctica</i> B	acetato de vinila butirato de vinila	-	KYRIAKOU et al., 2012
rutina, esculina	<i>C. antarctica</i> B	AG (palmítico, oleico)	14 líquidos iônicos	LUE et al., 2010a
rutina	<i>C. antarctica</i> B	AG (palmítico e láurico)	acetone	LUE et al., 2010b
isoorientina, isovitexina	<i>C. antarctica</i> B	AG (12C, 14C, 16C)	álcool terc-amílico acetona terc-butanol	MA et al., 2012

Continuação

Flavonoide	Lipase	Doador Acila	Meio Reacional	Referência
naringina, crisoeriol	<i>C. antarctica</i> B	AG (decanoico, láurico e esteárico) e seus ésteres vinílicos	<i>tert</i> -butanol, acetona	MELLOU et al., 2005
naringina	<i>C. antarctica</i> B	AG (oleico, linolênico e linoleico, linoleato de etila)	acetona, 2-metil-2-butanol, 2-metil-2-propanol, tetrahidrofurano, acetonitrila	MELLOU et al., 2006
naringina	<i>C. antarctica</i> B	AG (palmítico) e éster metílico de ácido palmítico	2-metil-2-butanol	PASSICOS, SANTARELLI; COULON, 2004
isoquercetina	<i>C. antarctica</i> B	ésteres de AG (decanoato de etila, caprilato de etila, caproato de etila, butirato de etila, laurato de etila, estearato de etila, palmitato de etila e oleato de etila)	2-metil-2-butanol	SALEM et al., 2010
isoramnetina-3-O-glicosídeo	<i>C. antarctica</i> B	butirato de etila laurato de etila	2-metil-2-butanol	SALEM et al., 2011
proantocianidina, antocianidina, naringina, quercetina	<i>C. antarctica</i> B	AG (palmítico, cinâmico, fenilpropionico, 2-hidroxi-, 4-hidroxi- e 3,4-dihidroxi fenilpropionico)	2-metil-2-propanol (<i>t</i> -butanol)	STEVENSON et al., 2006
silibina	<i>C. antarctica</i> B	AG (hexanodioico, dodecanodioico e hexadecanodioico)	acetona acetonitrila 2-metil-2-butanol 2-metil-2-propanol	THEODOSIOU et al., 2011
rutina	<i>C. antarctica</i> B	AG (C14-C18)	2-metil-2-butanol	VISKUPICOVA et al., 2010
silibina, rutina	<i>C. antarctica</i> B	AG (decanoico, láurico, butírico e oleico)	acetona, acetonitrila álcool <i>tert</i> -amílico álcool <i>tert</i> -butílico	XANTHAKIS et al., 2010
floridzina, isoquercitrina	<i>C. antarctica</i> B	AG (oleico, esteárico, linolênico, linoleico, EPA, DHA)	acetona	ZIAULLAH et al., 2013

1.4.1. Variáveis que influenciam as reações de acilação de flavonoides

Em reações de biotransformação, a composição do meio reacional exerce papel determinante. A imiscibilidade dos substratos consiste em um problema em particular (RAZAK e ANNUAR, 2015), portanto é importante a escolha de meios reacionais que permitam a solubilização adequada tanto do flavonoide glicosilado (molécula polar), quanto do doador acila (apolar), e que, ao mesmo tempo, permitam a mais alta atividade enzimática possível.

Solventes apróticos polares, tais como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida, tetrahydrofurano e piridina, foram inicialmente investigados para a transformação enzimática de flavonoides (NAKAJIMA et al., 1999), no entanto, observou-se que houve inativação da enzima com o uso desses solventes. Atualmente, os solventes mais utilizados nas reações de acilação de flavonoides são 2-metilbutan-2-ol e acetona, os quais apresentam baixa toxicidade e polaridades que permitem a solubilização adequada dos substratos, levando a altas taxas de conversão (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; MALIAR, 2012). Outros solventes orgânicos comumente utilizados são 2-metilpropan-2-ol, hexano e acetonitrila (DANIHELOVA; VISKUPICOVA; STURDIK, 2012).

Um estudo cinético da acilação da rutina com ácido láurico catalisada pela lipase CALB, em meio composto por acetona, indicou que a reação de biossíntese exibe um mecanismo do tipo ping-pong bi-bi sem inibição aparente pelos substratos. O estudo ainda confirmou, através de análises por ressonância magnética nuclear do carbono 13 (RMN 13C), o sítio exato de esterificação da rutina, como pode ser visto na Figura 7.

Os líquidos iônicos representam uma interessante alternativa ao emprego de solventes orgânicos em reações de biocatálise. Estes compostos são sais que não cristalizam à temperatura ambiente e que possuem características físico-químicas que potencialmente favorecem as reações de esterificação catalisadas por lipases, como ausência de pressão de vapor e alta estabilidade térmica, além de serem capazes de formar sistemas bifásicos. Além disso, possuem toxicidade reduzida quando comparados aos solventes orgânicos. Outras vantagens, incluindo o aumento da regioseletividade e da estabilidade da enzima, têm sido relatadas quando líquidos iônicos são empregados em vez de solventes orgânicos (LOZANO et al., 2004).

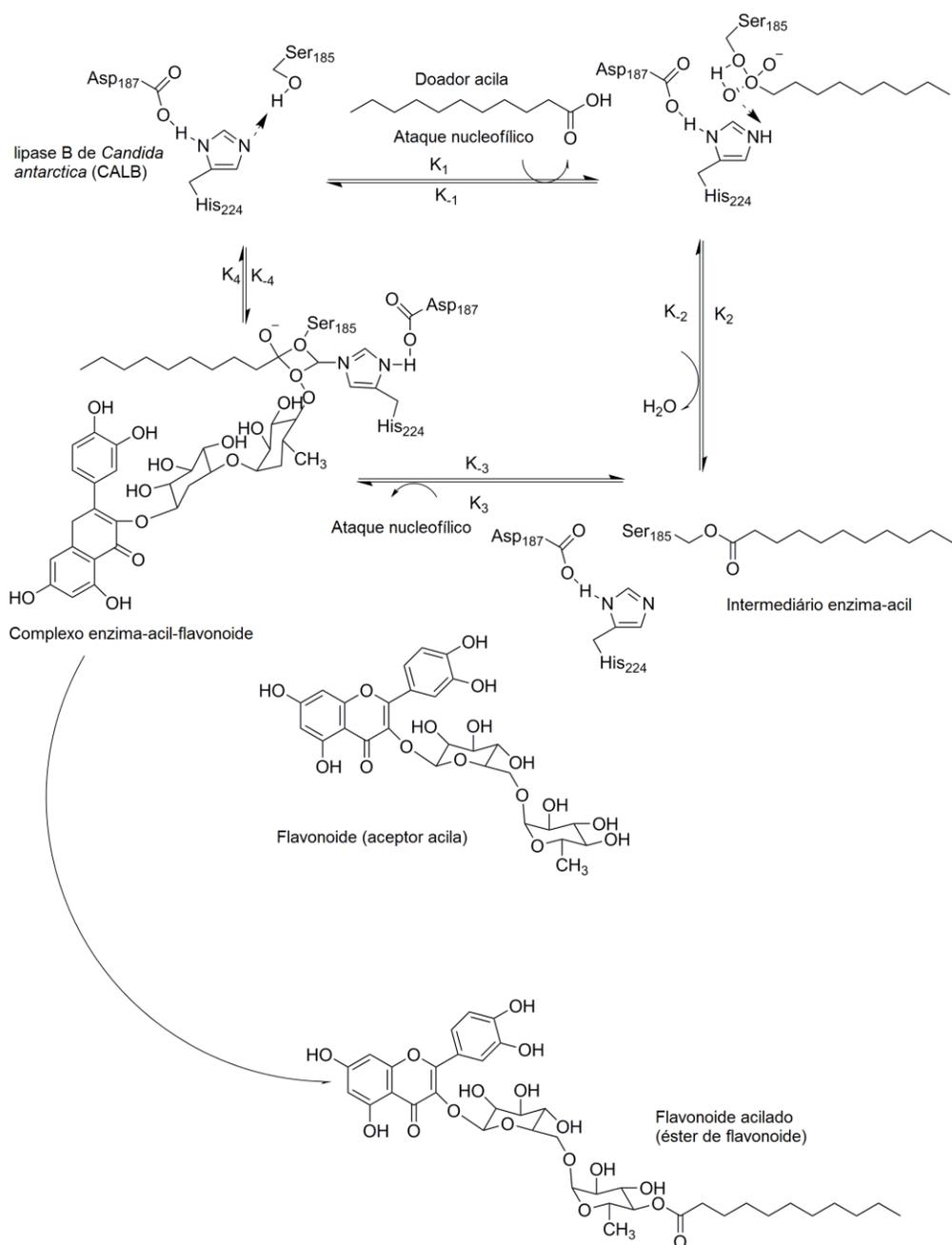
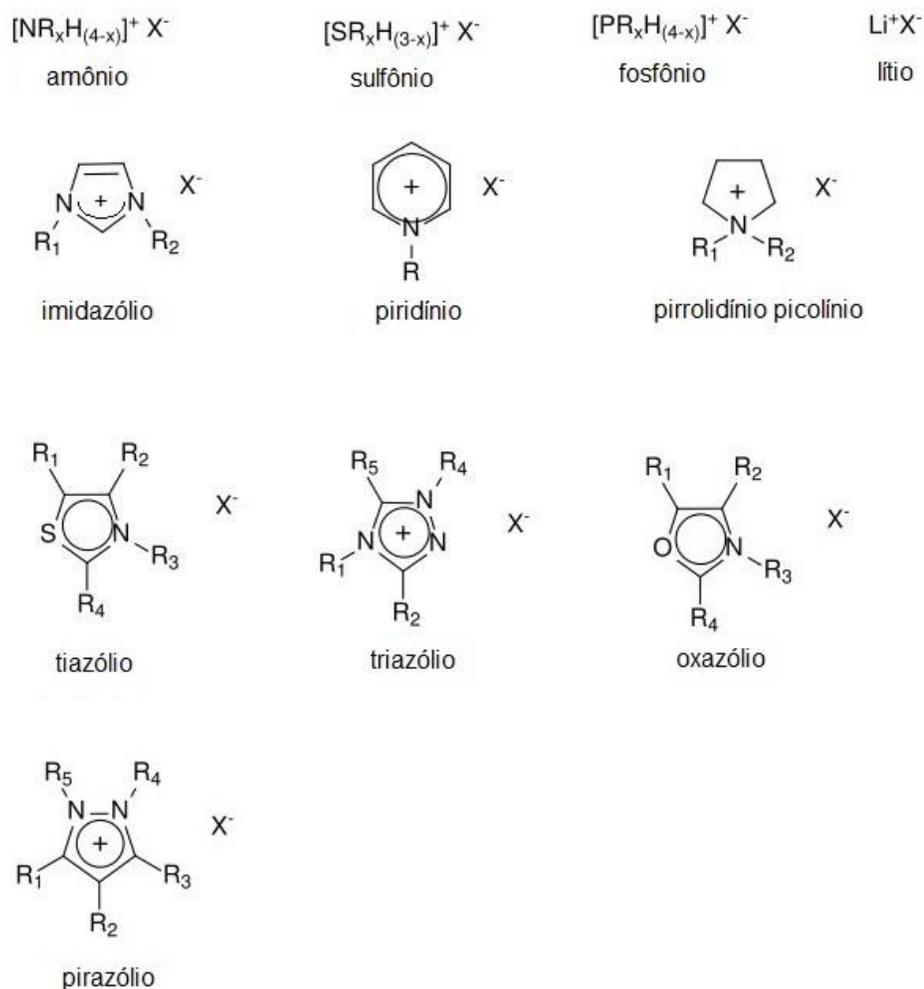


FIGURA 7. Acilação da rutina com ácido láurico catalisada pela lipase CALB (RAZAK e ANNUAR, 2015).

Os líquidos iônicos podem ser utilizados em processos biocatalíticos como solventes puros, como co-solventes em sistemas aquosos e em sistemas bifásicos (MOON et al., 2006a). A Figura 8 mostra alguns exemplos de cátions e ânions em líquidos iônicos.



X : BF_4 , PF_6 , $(CF_3SO_2)_2N$, SbF_6 , CF_3SO_3 , CF_3CO_2 , NO_3 ,
 $(C_2F_5SO_2)_2N$, $(FSO_2)_2N$, $(CF_3SO_2)_3C$, $ZnCl_3$, $CuCl_2SnCl_3$ etc.

FIGURA 8. Exemplos de cátions e ânions em líquidos iônicos (adaptado de MOON et al., 2006a).

Esses compostos podem ser sintetizados para ter diferentes polaridades, para serem miscíveis ou imiscíveis com a água ou para ter diferentes viscosidades, e estas propriedades podem influenciar a estabilidade e a atividade de enzimas (VAN RANTWIJK e SHELDON, 2007). Ao contrário de alguns solventes orgânicos polares, líquidos iônicos não inativam as enzimas. Este fato representa uma vantagem quando substratos polares são utilizados em reações catalisadas por enzimas (PARK e KAZLAUSKAS, 2001). Líquidos iônicos imiscíveis com a água, possuindo uma cadeia alquil longa hidrofóbica, tem menor tendência de remover a água essencial da enzima, resultando numa elevada atividade enzimática. As enzimas são normalmente ativas em líquidos iônicos contendo ânions BF_4 , PF_6 e Tf_2N (MOON et al., 2006a).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada na avaliação da influência de diversas variáveis na acilação de salicina, helicina, esculina e naringina, em acetona e em líquidos iônicos ([bmim]BF₄ e [bmim]PF₆), catalisada por CALB. A solubilidade dos glicosídeos foi maior em [bmim] BF₄, resultando em maiores taxas de conversão e regioseletividade em relação aos demais meios. Nas condições otimizadas, a taxa de acilação chegou a 87% (KATSOURA et al., 2007).

A solubilidade da rutina e da esculina em 14 em líquidos iônicos diferentes foi analisada utilizando a técnica COSMO-RS (*“Conductor-like Screening Model for Real Solvents”*), e a acilação destes flavonoides com AGs de cadeia longa (palmítico e oleico) catalisada por CALB foi efetuada. Os autores relataram que o tipo de ânion tinha uma maior influência sobre a atividade da CALB do que a porção catiônica. Líquidos iônicos contendo ânions TF₂N⁻, PF₆⁻ e BF₄⁻ levaram a maiores taxas de reação (98% para [TOMA]TF₂N), enquanto aqueles contendo ânions com propriedades de solvatação fortes levaram à diminuição das taxas. Este fato foi atribuído ao aumento das interações com a estrutura proteica da CALB (LUE et al., 2010a).

Em reações de acilação de flavonoides, é essencial limitar o teor de água do meio reacional, de forma a deslocar o equilíbrio da reação em direção à esterificação e minimizar a hidrólise. O teor de água necessária para o processo catalítico depende do tipo e forma da enzima (nativa ou imobilizada) e do solvente (ARROYO; SÁNCHEZ-MONTERO; SINISTERRA, 1999). Em geral, o teor de água ótimo para as reações de esterificação em solventes orgânicos varia entre 0,2 a 3,0% (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; MALIAR, 2012). Atividades enzimáticas elevadas para a CALB podem ser alcançadas quando o teor de água é de cerca de 200 ppm (ARDHAOUI et al., 2004b). Alguns autores relatam que o teor de água ideal para biocatálise em meio orgânico é 0,05% (v/v) (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003), e altas taxas de acilação podem ser alcançadas quando a atividade de água inicial é de 0,11 ou menos (KONTOGIANNI et al., 2003). A diminuição da taxa de conversão com o aumento do teor de água pode ser atribuída a limitações no transporte de substratos hidrofóbicos a partir do solvente através da camada de água que envolve a enzima (ZHAO, 2005).

Em quantidade maior que a necessária para solvatar a enzima e mantê-la ativa, o teor de água do meio diminui o rendimento da reação (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003; KONTOGIANNI et al., 2003). A adição de peneiras moleculares ao meio leva a um aumento significativo em seu rendimento (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003; MELLOU et al., 2005). As peneiras moleculares são formadas por aluminossilicatos sintéticos ou naturais, arranjados em uma macro estrutura cristalina, com canais internos de tamanho definido.

A natureza e comprimento de cadeia do doador acila exercem notável efeito sobre a acilação. A seleção de um doador acila adequado influencia significativamente as propriedades físico-químicas e biológicas dos derivados acilados resultantes. Vários agentes acilantes têm sido testados em reações de biossíntese de derivados acilados de flavonoides, sendo que os AGs têm recebido atenção especial por sua capacidade de aumentar a solubilidade destas moléculas em sistemas lipofílicos (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; STURDIK, 2009).

Em reações de esterificação da naringina e da rutina, foi reportado que as maiores taxas de conversão foram alcançadas quando utilizados AGs com cadeias até 10C (KATSOURA et al., 2006). No entanto, o efeito do comprimento da cadeia carbônica do AG ainda é alvo de debate.

A CALB é seletiva para AGs de cadeia curta e média. Este fato pode ser atribuído à estrutura do sítio de ligação da enzima, que é elíptico e estreito, similar a um funil, possuindo 9,5 x 4,5 Å. Em seu interior, o mais longo AG a se encaixar completamente possui 13C. Com o aumento no número de C de um AG ou o aumento do tamanho da molécula, o mecanismo de impedimento estérico é envolvido, resultando em baixa eficiência da reação enzimática (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). Este fato foi confirmado experimentalmente por outros estudos (KATSOURA et al., 2006; VISKUPICOVA e ONDREJOVIC, 2007), cujos resultados mostraram melhor performance da CALB na esterificação da naringina e da rutina com AGs de cadeia contendo até 10C. Experimentos com AGs saturados e insaturados mostraram uma correlação entre o log P dos AGs e as taxas de conversão encontradas (VISKUPICOVA e ONDREJOVIC, 2007).

A acilação da isoquercitrina em 2-metil-2-butanol, catalisada pela lipase CALB, se mostrou altamente dependente do comprimento da cadeia carbônica do doador acila, decrescendo de 66% para o butirato de etila para 38% para o estearato de etila (SALEM et al., 2010). Comportamento similar foi observado para a acilação da naringina e da rutina com lipase CALB utilizando AGs e seus ésteres vinílicos em líquidos iônicos. Nesse estudo, a maior taxa de conversão, aproximadamente 65%, foi observada para doadores acila de cadeia curta (KATSOURA et al., 2006).

Em contraste, um trabalho relatou que o comprimento da cadeia carbônica do AG não demonstrou efeito significativo nas taxas de conversão quando AGs de cadeia média e longa foram utilizados (KONTOGIANNI et al., 2003).

Outro estudo, sobre a acilação da rutina com CALB utilizando AGs com 6 a 18C, mostrou que para AGs com até 12C as taxas de conversão aumentaram com o aumento da cadeia,

enquanto para AGs com cadeias maiores não foram encontradas diferenças significativas (ARDHAOUI et al., 2004b).

Na acilação da isoquercitrina catalisada por CALB, as taxas iniciais de reação foram similares para doadores acila com 4 a 12C (em torno de 17×10^{-3} mmol/h) (SALEM et al., 2010). Entretanto, outro estudo relatou não haver influência do comprimento de cadeia do doador acila na acilação da naringina por AGs ou seus ésteres vinílicos (MELLOU et al., 2006).

A Tabela 1 resume alguns estudos sobre a influência do comprimento da cadeia e da natureza do doador acila na acilação enzimática de flavonoides.

TABELA 1. Influência do comprimento da cadeia carbônica e da natureza do doador acila na acilação enzimática de flavonoides.

Flavonoide	Doador acila	Taxa de conversão (%)	Referência
naringina	AGs até 4 C	65,0 (a)	KATSOURA et al., 2006
rutina	laurato de vinila	23,0 (a)	
rutina	ácido octanoico	14,8 (b), 17,7 (c)	KONTOGIANNI et al., 2001
	ácido decanoico	24,0 (b), 22,0 (c)	
	ácido láurico	13,5 (b), 23,0 (c)	KONTOGIANNI et al., 2003
naringina	ácido octanoico	19,6 (b), 30,1 (c)	KONTOGIANNI et al., 2001
	ácido decanoico	21,9 (b), 18,3 (c)	
	ácido láurico	18,2 (b), 15,8 (c)	KONTOGIANNI et al., 2003
naringina	ácido decanoico	20,0 (b), 25,0 (c)	MELLOU et al., 2005
	ácido láurico	23,0 (b), 27,0 (c)	
	ácido esteárico	19,0 (b), 22,0 (c)	
	decanoato de vinila	54,0 (b), 65,0 (c)	
	laurato de vinila	59,0 (b), 70,0 (c)	
isoquercitrina	estearato de vinila	48,0 (b), 58,0 (c)	SALEM et al., 2010
	butirato de etila	66,0 (d)	
	estearato de etila	38,0 (d)	

Meios de reação: (a) líquidos iônicos, (b) terc-butanol, (c) acetona, (d) 2-metil-2-butanol

A relação molar entre o doador acila e o flavonoide exerce influência significativa sobre a acilação. Vários autores têm tentado determinar a melhor relação molar para atingir as mais

altas taxas de conversão. O excesso de doador acila pode levar a maiores conversões, como reportado (PATTI; PIATTELLI; NICOLOSI, 2000). Na acilação de flavonoides o reagente em excesso geralmente é o agente acilante, devido ao seu custo e disponibilidade.

Em geral, relatos da literatura empregam razões molares doador acila/flavonoide entre 5:1 e 15:1. Muitos autores relatam que 5:1 é a razão mais eficaz para as reações de acilação de flavonoides (MELLOU et al., 2006; GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003; KONTOGIANNI et al., 2001). A variação nas razões molares doador acila/flavonoides relatadas pode ser atribuída a interações entre esta e outras variáveis que influenciam a reação de acilação. Contrariamente a esses relatos, um estudo utilizou um pequeno excesso de flavonoides (quercetina e naringina) em relação ao doador acila (acetato de vinila), em uma razão de 3:1. No caso da quercetina, a acilação ocorreu nas posições 3'-OH ou 4'-OH do anel B, levando à formação de 4'-O-acetil quercetina e 3'-O-acetil quercetina, a última em uma razão 3 vezes superior à primeira. A presença de um único grupo fenólico no anel B da naringenina (posição 4') levou à formação de um único produto, a 4'-O-acetil naringenina, enquanto a ausência da dupla ligação na posição C2-C3 do anel B do flavonoide levou a um aumento da flexibilidade, ocasionando maiores taxas de acilação (71%) (KYRIAKOU et al., 2012).

A temperatura representa um fator de influência significativa em reações catalisadas por enzimas, devido à sua capacidade de alterar a viscosidade do meio de reação e a solubilidade dos substratos e à ativação e inativação térmica da enzima.

Dado que a CALB é uma enzima termoestável, temperaturas mais elevadas podem aumentar sua atividade catalítica (ARROYO; SÁNCHEZ-MONTERO; SINISTERRA, 1999). A literatura relata a acilação de flavonoides catalisada por lipases em temperaturas que variam de 30°C a 100°C (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; MALIAR, 2012). Muitas vezes, a melhor atividade enzimática é alcançada quando a acilação é realizada em temperaturas por volta de 60°C, o que permite uma boa solubilidade dos substratos e, portanto, maiores taxas de conversão (VISKUPICOVA et al., 2010; KATSOURA et al., 2006; VISKUPICOVA et al., 2006; STEVENSON et al., 2006; ARDHAOUI et al., 2004a,b; ENAUD et al., 2004; PASSICOS, SANTARELLI; COULON, 2004; GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003). Entretanto, relatos demonstram uma diminuição de 30% na atividade da CALB após 1 dia de incubação a 80°C durante a acilação da floridzina, fato que foi atribuído à desnaturação da enzima e a uma possível interação entre a CALB e o cinamato de etila (ENAUD et al., 2004). Estudos indicam que o aumento da temperatura de reação pode ajudar a reduzir limitações de transferência de

massa, efeito descrito para a acilação da rutina e da esculina comerciais com os ácidos palmítico e oleico catalisada por CALB em líquidos iônicos (LUE et al., 2010a).

Face ao exposto, fica evidente a relevância de estudos sobre a reação de acilação de flavonoides catalisada pela CALB que investiguem a influência das variáveis descritas nas taxas de bioconversão desses compostos em derivados acilados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Biossintetizar diferentes derivados de flavonoides a partir de reações de acilação de hesperidina, naringina e rutina com ácidos graxos, utilizando como biocatalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CALB).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade e termoestabilidade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB);
- Investigar as variáveis reacionais que influenciam a reação de acilação enzimática da hesperidina com ácido decanoico e otimizar o processo de biossíntese deste derivado por delineamento experimental;
- Avaliar o efeito da cadeia carbônica dos ácidos graxos (6C – 18C) na taxa de conversão dos flavonoides em derivados acilados;
- Estabelecer um processo de purificação simples e eficaz para recuperação dos derivados acilados de flavonoides do meio reacional;
- Determinar o coeficiente de partição dos derivados acilados de flavonoides em octanol/água.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Determinação da atividade e estabilidade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

A CALB (Novozyme 435, Sigma-Aldrich) é uma enzima comercial recombinante (expressa em *Aspergillus niger*) imobilizada em resina macroporosa de troca iônica do tipo acrílica. Para determinação da atividade da CALB foi utilizado o método descrito por Yamada, Ota e Machida (1962). Os AGs livres formados a partir da hidrólise enzimática de uma emulsão de óleo de oliva comercial foram titulados com uma solução de NaOH 0,1 M. A emulsão de óleo de oliva foi preparada utilizando 25 mL de óleo de oliva e 75 mL de solução de álcool polivinílico a 4%. A mistura foi emulsificada através de homogeneização por 6 min em agitador de tubos, e 4 mL dessa emulsão foram incubados em 5 mL de tampão fosfato (pH 6,5) com 1 mL de CALB preparada em tampão fosfato (pH 6,5) na concentração de 100 mg/mL, a 40°C, por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 15 mL de etanol (95%, v/v). A atividade da CALB responsável pela liberação de 1 μ mol de ácidos graxos livres, a partir do óleo de oliva, por minuto a temperatura ambiente, definida como U/min (unidade de atividade enzimática por minuto de reação), foi calculada com auxílio de uma curva-padrão de ácido oleico (100 – 2100 μ mol) (Apêndice I).

Para verificar a termoestabilidade da CALB nas condições usadas para a reação de acilação, a lipase (0,2 g) adicionada a 2,0 mL de acetona foi incubada a temperaturas que variaram de 30 a 50°C por 6, 12 e 24 h em agitador rotativo a 70 rpm. Após o tratamento, 1 mL deste extrato foi acrescentado ao sistema de reação contendo o substrato óleo de oliva, para se medir a atividade residual de hidrólise, expressa como % em relação a atividade enzimática antes do período de incubação.

3.2. Otimização da biossíntese de decanoato de hesperidina por metodologia de superfície de resposta (MSR)

A metodologia de superfície de resposta (MSR), baseada em um design central composto rotacional (DCCR), foi empregada para otimizar as taxas de biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela lipase CALB em meio de reação composto por líquido iônico ([bmim][BF₄]) e/ou solvente orgânico (acetona), de acordo com o método descrito por Araújo et al. (2011). Foram analisadas três variáveis experimentais, a saber: razão

molar em massa hesperidina/ácido decanoico, razão [bmim][BF₄]/acetona e concentração de lipase. Os níveis e variáveis estudados podem ser vistos nas Tabelas 2 e 3. O DCCR do tipo 2³ foi definido com auxílio do software Statistic 7.0 (Statsoft) para três variáveis (fatores), num total de 18 ensaios, seis pontos axiais (α) e quatro repetições no ponto central para estimar o erro experimental e investigar a adequação do modelo proposto.

Em tubos com tampa de rosca, 100 mM de hesperidina juntamente com ácido decanoico (ajustado para diferentes razões molares) foram solubilizados em 10 mL de meio de reação. Foram acrescentadas diferentes concentrações de CALB (2,0 – 14,0 mg/mL) e a mistura foi incubada a 50°C em shaker com agitação de 150 rpm por um tempo máximo de 144 h. O conteúdo de água do meio reacional foi determinado através de equipamento coulométrico Karl Fischer (KF Titrino Plus 737II). Peneiras moleculares ativadas (4 Å, 100 g/L) foram acrescentadas após 50 e 80 h de reação, para controlar o conteúdo de água do meio reacional. Com o objetivo de determinar a cinética da reação, os ensaios foram monitorados periodicamente (48, 72, 96 e 144 h de reação). A análise por UHPLC-MS permitiu a determinação das taxas de conversão (%) da hesperidina em decanoato de hesperidina.

As condições estabelecidas no processo de otimização da biossíntese de decanoato de hesperidina foram utilizadas para direcionar os ensaios de acilação dos flavonoides rutina, hesperidina, naringina e quercetina com AGs de 6 a 18C, oferecendo um parâmetro para a seleção das condições de reação (item 3.4).

TABELA 2. Variáveis e níveis do design central composto rotacional para a biossíntese de derivados acilados da hesperidina com ácido decanoico catalisada pela lipase CALB.

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Relação molar entre os substratos (flavonoide:doador acila)	X1	1:1	1:3	1:5	1:7	1:9
Relação entre líquido iônico e solvente orgânico (%)	X2	100:0	80:20	50:50	20:80	0:100
Concentração de enzima (mg/mL)	X3	2,0	4,4	8,0	11,6	14,0

TABELA 3. Valores codificados do design central composto rotacional para a biossíntese de derivados acilados da hesperidina com ácido decanoico catalisada pela lipase CALB.

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

3.3. Quantificação dos compostos por UHPLC-MS (cromatografia líquida de pressão ultra elevada acoplada a espectrometria de massa)

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

volts, temperatura da fonte de 150°C, e temperatura de dessolvatação de 350°C. A quantificação dos compostos foi realizada com o auxílio de curvas-padrão determinadas através da injeção de padrões dos flavonoides de interesse em concentrações entre 30 e 300 µg/mL.

3.4. Reação de acilação de flavonoides com diferentes ácidos graxos

Foram selecionados os flavonoides naringina, rutina, hesperidina e quercetina e doadores acila com cadeias carbônicas de diferentes tamanhos, variando entre 6C e 18C (ácidos hexanoico, octanoico, decanoico, láurico e oleico). Os testes foram realizados de acordo com o método descrito por Ziaullah et al. (2013) com algumas modificações. O meio de reação, composto por 5mL de acetona, foi previamente tratado com 100mg/mL de peneiras moleculares 4Å ativadas em estufa (100°C, 1 h) por 12 h previamente à reação. A relação molar em massa entre o flavonoide e o doador acila empregada foi de 1:5 (0,575 mmol de flavonoide e 2,875 mmol de ácido graxo). Após a solubilização dos reagentes no meio de reação, utilizando agitador magnético, foram acrescentados 0,65 g de CALB por ensaio. Os ensaios foram incubados em frascos vedados, em shaker a 45°C, com agitação de 100 rpm, e alíquotas foram retiradas após 12 e 24 h de incubação. As amostras foram congeladas a -20°C e encaminhadas para análise por cromatografia líquida de pressão ultra elevada acoplada a espectrometria de massa (UHPLC-MS) para determinação das taxas de conversão dos flavonoides em derivados acilados (item 3.3).

3.5. Purificação dos derivados acilados de flavonoides

A extração dos derivados acilados de flavonoides foi realizada segundo método descrito por Lue et al. (2010b). A acetona do meio reacional foi removida por evaporação com nitrogênio. A mistura foi então lavada duas vezes com hexano/água (4:1, v/v), com agitação, para remoção dos ácidos graxos livres. A cada lavagem, a mistura foi submetida a centrifugação (2800 rpm, 2 min), e a fase orgânica, contendo os ácidos graxos livres, desprezada. As amostras foram liofilizadas e conservadas a -20°C para análise por UHPLC-MS (item 3.3) e determinação das atividades biológicas (Capítulo II).

3.6. Determinação do coeficiente de partição dos derivados acilados de flavonoides em octanol/água

O coeficiente de partição em octanol/água (k) dos flavonoides padrão (rutina, hesperidina, naringina e quercetina) e dos derivados acilados decanoato de rutina, decanoato de hesperidina e decanoato de naringina foi analisado a fim de determinar o grau de lipofilicidade dos compostos. A determinação foi realizada segundo método descrito por Xavier (2006). Em tubos de ensaio foram adicionados 2,0 mL de uma solução de amostra na concentração de 50 μ M e 2,0 mL de octanol saturado com água. A mistura foi agitada durante 1 min e centrifugada por 15 min a 3000 rpm. Após filtração em filtros de polietileno de 0,22 μ m com membrana PTFE (Millipore Ltd, EUA), a concentração do composto foi determinada em cada uma das fases por UHPLC-MS conforme método descrito no item 3.6. O coeficiente de partição foi obtido de acordo com a seguinte equação:

$$k = \frac{C_o}{C_a \times r}$$

onde: C_o = concentração do composto teste no octanol; C_a = concentração do composto teste na solução aquosa; r = razão dos volumes entre a fase oleosa e a aquosa.

3.7. Análise estatística

Os ensaios de determinação da atividade e estabilidade da lipase CALB (item 3.1) e as reações de acilação dos flavonoides com AGs de 6 a 18C (item 3.4) foram realizados em triplicata. A significância estatística dos resultados foi acessada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças identificadas foram analisadas através de teste t de Student não pareado, utilizando o software estatístico OriginPro8 (OriginLab). Probabilidades associadas (p-valor) de menos de 5% foram consideradas significativas.

Para os ensaios de otimização da biossíntese do decanoato de hesperidina por MSR (item 3.2), o teste t de Student foi usado com a finalidade de determinar a significância estatística dos coeficientes de regressão. A significância dos dados foi testada usando ANOVA, e variáveis com intervalo de confiança maior que 90% foram consideradas como significativamente significativas nas taxas de conversão. As análises foram realizadas com auxílio do software Statistic 7.0 (Statsoft).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade enzimática e termoestabilidade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

A atividade enzimática da CALB, determinada através da hidrólise de uma emulsão de óleo de oliva, seguida pela titulação com uma solução de NaOH 0,1 M com auxílio de uma curva-padrão de titulação do ácido oleico (Apêndice I), foi equivalente a 103,47 U/min, sendo U (unidade de atividade enzimática) a atividade da lipase responsável pela liberação de 1 μmol de ácidos graxos livres, a partir do óleo de oliva, por min.

A Figura 9 mostra a termoestabilidade da CALB avaliada em diferentes temperaturas e tempos de incubação na presença do solvente acetona. Estas condições foram escolhidas com o objetivo de avaliar a estabilidade da enzima nas mesmas condições usadas na reação de acilação.

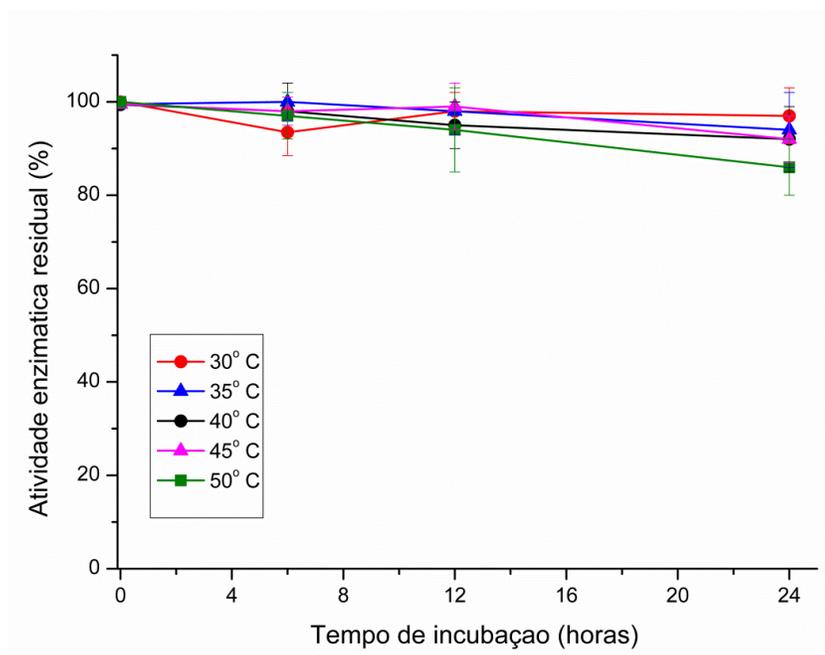


FIGURA 9. Termoestabilidade da CALB após 6, 12 e 24 h de incubação em acetona. Dados representados como média \pm desvio padrão de ensaios em triplicata.

Pode-se observar que a CALB é altamente estável, capaz de manter praticamente 100% de sua atividade na faixa de temperatura de 30 a 50°C. Uma pequena diminuição na atividade foi observada somente após 24 h de incubação na temperatura de 50°C. Nestas condições a enzima mantém aproximadamente 90% de sua atividade (Figura 9). Os resultados mostram, portanto, que as condições de acilação utilizadas neste trabalho (12 h de reação em sistema solvente contendo acetona a 45°C) não levam à diminuição da atividade enzimática.

A enzima pode sofrer mudanças em sua estrutura por influência direta tanto da temperatura como pela presença do solvente orgânico. Assim, os dois fatores foram avaliados a fim de verificar sua influência simultânea na atividade da CALB. A enzima imobilizada se encontra numa forma mais rígida, devido as suas ligações ao suporte. Essa rigidez diminui a flexibilidade da enzima, mantendo a forma do sítio ativo, que é responsável por sua atividade e maior estabilidade (TREVAN, 1980).

4.2 Efeito dos parâmetros reacionais e da presença de líquido iônico na biossíntese de decanoato de hesperidina

A Figura 10 ilustra o progresso da biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela lipase CALB, em função do tempo de reação (h) e do conteúdo de água do meio (ppm).

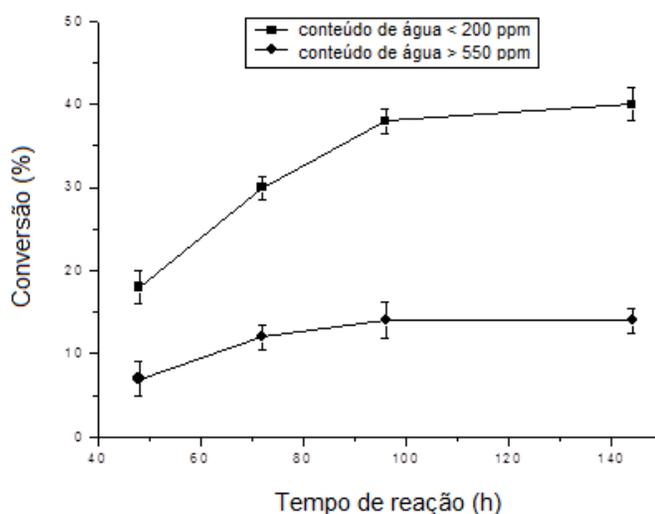


FIGURA 10. Progresso da biossíntese de derivados acilados da hesperidina (100 mM) com ácido decanoico (500 mM) catalisada pela lipase CALB (8,0 mg/mL em meio composto por [bmim]BF₄ e acetona (5:5, v/v) a 50 °C (ARAÚJO et al., 2011).

As taxas de biossíntese de do decanoato de hesperidina atingem seu máximo após 96 h de reação e lentamente alcançam um platô correspondente ao equilíbrio termodinâmico. O conteúdo de água do meio reacional também se mostrou determinante, dado que seu aumento levou a um decréscimo considerável na porcentagem de derivados acilados biossintetizados. Assim, a taxa de conversão caiu de 39,7 para 14,0% quando o conteúdo de água aumentou de < 200 ppm para mais de 500 ppm (Figura 10).

As respostas (em taxas de conversão, %) do DCCR para a biossíntese do decanoato de hesperidina catalisada pela CALB podem ser vistas na Tabela 4.

TABELA 4. Design central composto rotacional e respostas (taxas de conversão, %) para biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela CALB após 96 h de reação.

Ensaio	X1	X2	X3	Taxa de conversão observada (%) ^a	Taxa de conversão esperada (%) ^a
1	-1	-1	-1	29,2	29,25
2	+1	-1	-1	47,0	44,45
3	-1	+1	-1	28,2	23,47
4	+1	+1	-1	23,7	27,07
5	-1	-1	+1	42,5	40,67
6	+1	-1	+1	55,3	55,87
7	-1	+1	+1	27,2	34,89
8	+1	+1	+1	38,3	38,49
9	-1,68	0	0	23,1	23,01
10	+1,68	0	0	39,2	38,79
11	0	-1,68	0	48,5	49,72
12	0	+1,68	0	35,1	30,26
13	0	0	-1,68	24,3	30,39
14	0	0	+1,68	50,2	49,58
15	0	0	0	42,0	39,99
16	0	0	0	38,6	39,99
17	0	0	0	39,5	39,99
18	0	0	0	43,3	39,99

^aTaxas de conversão referentes à porcentagem total de derivados acilados formada

Houve uma variação considerável nas taxas de conversão da hesperidina em derivados acilados nos diversos ensaios realizados, o que indica que as variáveis independentes (fatores) e seus níveis exercem influência significativa no processo. A maior taxa de conversão (55,3%) foi obtida no ensaio 6, usando uma razão molar entre os substratos hesperidina/ácido decanoico de 1:7, uma razão [bmim][BF₄]/acetona de 8:2 (v/v) e 11,6 mg/mL de CALB. Quando comparados os valores (taxas de conversão) esperados e observados, nota-se uma forte correlação entre os mesmos (Tabela 4).

Os coeficientes de regressão (Tabela 5) mostram que os efeitos dos três fatores analisados foram estatisticamente significativos ($p < 0,1$) em um intervalo de confiança de 90%.

TABELA 5. Coeficientes de regressão do design central composto rotacional para a para biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela CALB após 96 h de reação.

	Regressão	Erro padrão	t(8)	p	-90,%	+90,%
Média/Interc.*	40,8465	2,06081	19,8205	0,00000	36,0943	45,5988
X1 ^a (L)(L)*	4,7039	1,11755	4,2091	0,00296	2,1268	7,2810
X(Q)(Q)*	-3,3864	1,16242	-2,9132	0,01949	-6,0670	-0,7059
X2 ^b (L)*	-5,7903	1,11755	-5,1812	0,00084	-8,3674	-3,2132
X2(Q)	0,2983	1,16242	0,2566	0,80393	-2,3822	2,9788
X3 ^c (L)*	5,7100	1,11755	5,1093	0,00091	3,1329	8,2871
X3(Q)	-1,2606	1,16242	-1,0844	0,30974	-3,9411	1,4199
X1L x X2L*	-2,9000	1,45951	-1,9869	0,08215	-6,2656	0,4656
X1L x X3L	1,3750	1,45951	0,9420	0,37372	-1,9906	4,7406
X2L x X3L	-0,9500	1,45951	-0,6509	0,53335	-4,3156	2,4156

* efeitos estatisticamente significativos

^arazão molar hesperidina/ácido decanoico

^b razão [bmim][BF₄]/acetona (v/v), ^c concentração de lipase (mg/mL).

Os coeficientes selecionados para os efeitos lineares foram a razão molar entre os substratos, a razão [bmim][BF₄]/acetona e a concentração de CALB, além do efeito quadrático da razão molar entre os substratos. As interações entre os efeitos da razão molar entre os substratos e a razão [bmim][BF₄]/acetona também foram significativas. A ANOVA gerou a equação de regressão a seguir (em termos de valores codificados):

$$Y = 39,99 + 4,70 \cdot X1 - 3,22 \cdot (X1)^2 - 5,79 \cdot X2 + 5,71 \cdot X3 - 2,90 \cdot X1 \cdot X2,$$

onde Y é a taxa de conversão (%) (resposta) e X1, X2 e X3 são os valores codificados das variáveis independentes (fatores): razão molar entre os substratos hesperidina/ácido decanoico, razão [bmim][BF₄]/acetona e concentração de CALB, respectivamente.

O valor de R² (0,8855) indica a precisão do modelo e provê uma medida de quanto da variabilidade nos valores observados para as respostas pode ser explicado pelos fatores experimentais e suas interações. A significância estatística da equação de modelo de segunda ordem foi avaliada pelo teste F, que demonstrou que essa regressão foi estatisticamente significativa (p < 0,1) no intervalo de confiança de 90% (Tabela 6).

TABELA 6. ANOVA para o design central composto rotacional após 96 h de reação de biossíntese de decanoato de hesperidina catalisada pela CALB.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F	p
Regressão	1412	5	282,476	18,56	0,000028
Residual	183	12	15,21833		
Falta de ajuste	169	9	18,77778	4,14	
Erro puro	14	3	4,54		
Total	1595	17			

Coefficiente de regressão: R² = 0,8855/F_{0,1;5;12} = 2,39.

A porcentagem de derivados acilados biossintetizados através da acilação da hesperidina com ácido decanoico aumentou quando a razão molar flavonoide/doador acila diminuiu, e também quando as quantidades de líquido iônico e de CALB aumentaram (Figuras 11, 12 e 13).

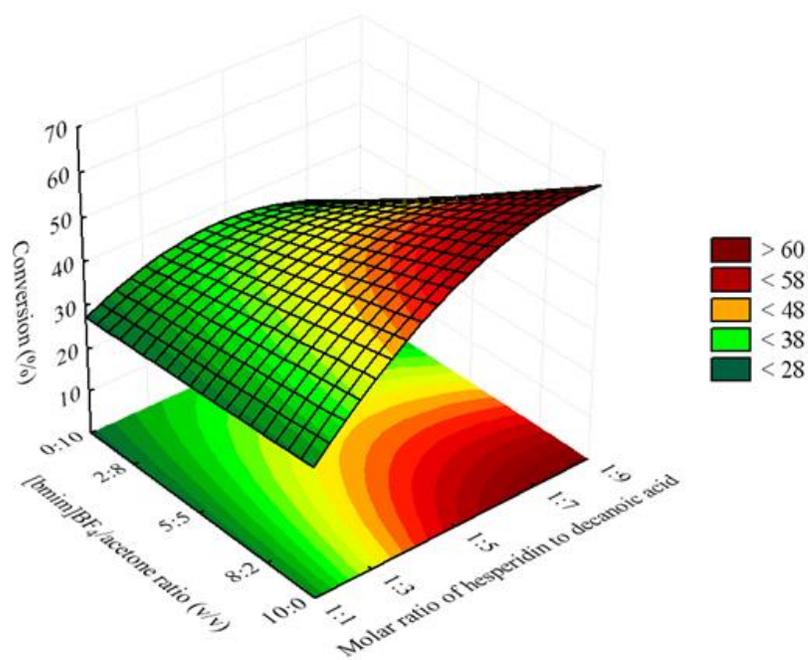


FIGURA 11. Superfície de resposta para a biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela CALB (11,6 mg/mL) a 50°C por 96 h, como função da razão molar hesperidina/ácido decanoico e da razão [bmim][BF₄]/acetona.

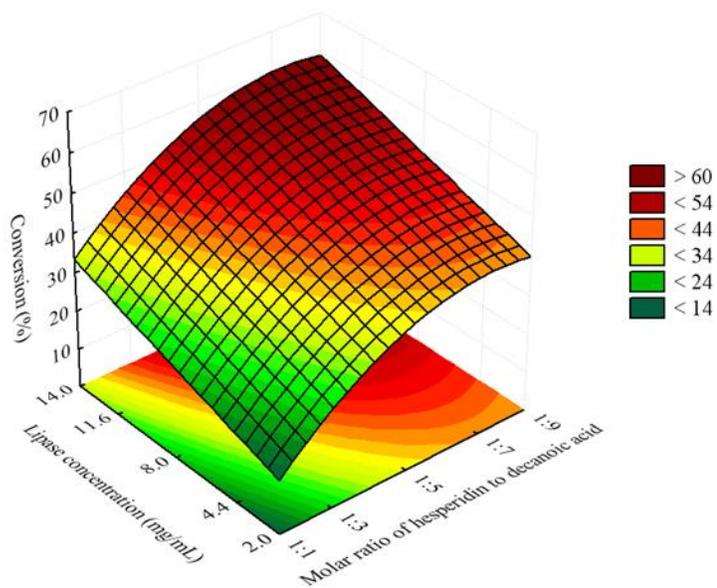


FIGURA 12. Superfície de resposta para a biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela CALB (11,6 mg/mL) a 50°C por 96 h, como função da razão molar hesperidina/ácido decanoico e da concentração de CALB. A razão [bmim][BF₄]/acetona foi fixada em 8:2 (v/v).

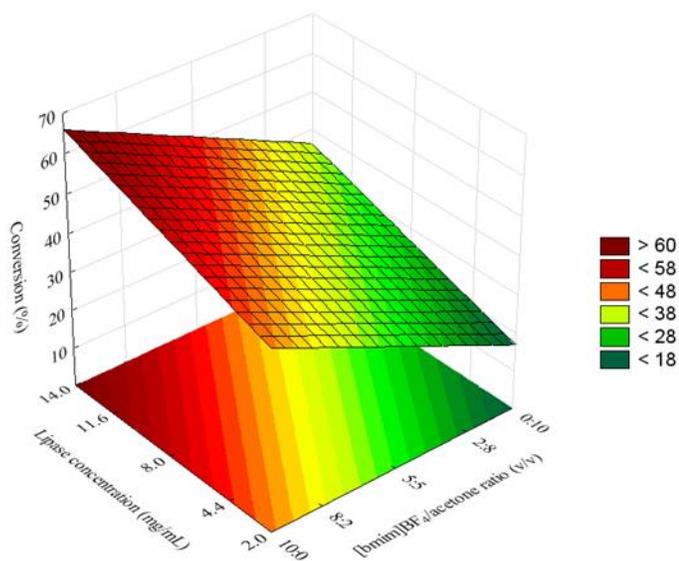


FIGURA 13. Superfície de resposta para a biossíntese de derivados acilados de hesperidina com ácido decanoico catalisada pela CALB (11,6 mg/mL) a 50°C por 96 h, como função da razão [bmim][BF₄]/acetona e da concentração de CALB. A razão molar hesperidina/ácido decanoico foi fixada em 1:7.

O efeito positivo da razão molar doador acila/álcool nas taxas de conversão também foi relatado para a acilação enzimática de açúcares e glicosídeos em vários meios orgânicos (COULON et al., 1996; KONTOGIANNI et al., 2003; MELLOU et al., 2005). Esse efeito pode ser atribuído a uma alteração termodinâmica do equilíbrio em direção à biossíntese do derivado acilado devido à presença de excesso de doador acila.

Um estudo sobre a acilação da naringina com o ácido decanoico demonstrou que a variação na concentração da CALB levou a um aumento na taxa de conversão. Entretanto, um platô foi alcançado quando a concentração de CALB foi maior que 15 g/L. A maior taxa de conversão foi de 40% após 240 h de incubação (KONTOGIANNI et al., 2003). A afinidade da enzima pela hesperidina pode ser atribuída à especificidade desta para grupos hidroxila primários presentes no resíduo glicosídico do flavonoide, como previamente relatado para a naringina (MELLOU et al., 2006).

4.3. Efeito do tipo de flavonoide e do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos na taxa de conversão

Em uma etapa preliminar, foram empregados os flavonoides rutina, hesperidina, naringina e também a quercetina (com o objetivo de verificar a capacidade da CALB de catalisar a acilação de flavonoides agliconas). Os doadores acila testados nesta etapa foram os ácidos hexanoico, octanoico, decanoico, láurico e oleico. A acetona foi escolhida como solvente para esta reação, por fornecer melhor rendimento, adequada solubilização dos substratos e facilidade de purificação ao fim da reação (CHEBIL et al., 2006).

Na Tabela 7 constam as massas (m/z) dos flavonoides padrão e as massas (m/z) estimadas para os derivados acilados a serem biossintetizados, calculadas através da massa molecular dos flavonoides e dos AGs empregados como doadores acila.

TABELA 7. Massas (m/z) UHPLC-MS dos flavonoides padrão e estimadas para seus derivados acilados com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica.

Flavonoide	Rutina	Naringina	Hesperidina	Quercetina
Padrão	610	580	610	301
Derivado acilado com ácido hexanoico	708	678	708	399
Derivado acilado com ácido decanoico	764	734	764	455
Derivado acilado com ácido octanoico	736	706	736	427
Derivado acilado com ácido láurico	792	762	792	483
Derivado acilado com ácido oleico	874	844	874	565

Os cromatogramas obtidos após as reações foram analisados em comparação ao cromatograma padrão (tempo zero de reação) (Apêndices III a V). A identificação foi realizada pela m/z de cada composto. Os derivados acilados biossintetizados, por apresentarem uma cadeia com mais átomos de carbonos devido aos doadores acila da reação, ligados aos flavonoides, ficam adsorvidos na coluna em fase reversa (altamente apolar) por mais tempo,

atrasando sua eluição e conferindo a este composto um tempo de retenção de consideravelmente maior que o observado para os flavonoides que não sofreram acilação.

A Tabela 8 mostra as porcentagens de derivados acilados de rutina, naringina e hesperidina biossintetizados com os ácidos hexanoico, octanoico e decanoico.

Os cálculos das porcentagens de derivados acilados biossintetizados foram realizados utilizando as equações das retas obtidas com o padrão de hesperidina e com o padrão de rutina demonstradas abaixo:

$$\text{Concentração de hesperidina } (\mu\text{g/ml}) = (4 \times 10^{-5})(\text{área do pico}) + 112,28$$

$$\text{Concentração de rutina/naringina } (\mu\text{g/ml}) = (6 \times 10^{-5})(\text{área do pico}) + 256,71$$

A maior porcentagem de biossíntese dos derivados acilados de flavonoides foi observada com a hesperidina, seguida da rutina e naringina (Tabela 8). No presente estudo, não ocorreu acilação da quercetina com os doadores acila empregados. Este resultado está de acordo com a maioria dos relatos sobre a CALB disponíveis na literatura (CHEBIL et al., 2006). A lipase CALB é capaz de acilar flavonoides especificamente em sua porção glicosídica, sem afetar o núcleo flavonoide, responsável por sua atividade antioxidante (CHEBIL et al., 2006).

Após a quantificação dos resultados, foram analisadas as amostras purificadas a fim de avaliar a pureza dos compostos obtidos pela acilação enzimática dos flavonoides. A concentração dos derivados acilados de flavonoides após purificação pode ser observada na Tabela 9. Não foi possível quantificar os derivados acilados da hesperidina, possivelmente devido à baixa concentração desses compostos nas amostras analisadas.

Relatos da literatura indicam maiores taxas de conversão pela CALB na acilação da naringina e da rutina quando empregados AGs com até 10 C (KATSOURA et al., 2006; VISKUPICOVA e ONDREJOVIC, 2007). A seletividade da CALB para AGs de cadeia curta e média se deve à estrutura de seu sítio de ligação, elíptico e estreito. Assim, conforme o número de C do AG aumenta, ocorre um impedimento estérico, que reduz a eficiência da conversão enzimática (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). Entretanto, alguns relatos da literatura indicam que o comprimento da cadeia carbônica do AG não exerce influência significativa quando são utilizados AGs de cadeia média e longa (ARDHAOUÏ et al., 2004b; KONTOGIANNI et al., 2003).

TABELA 8. Porcentagem dos derivados acilados de flavonoides biossintetizados após acilação com ácidos de cadeia carbônicas diferentes catalisada pela CALB determinadas por UHPLC-MS

Flavonoide	Éster	Tempo de Reação (h)	Esterificação (%)
Rutina	Hexanoato de Rutina	12	24,90
	Hexanoato de Rutina	24	20,27
	Octanoato de Rutina	12	37,95
	Octanoato de Rutina	24	51,29
	Decanoato de Rutina	12	-
	Decanoato de Rutina	24	28,71
	Laurato de Rutina	12	-
	Laurato de Rutina	24	9,34
	Oleato de Rutina	12	-
	Oleato de Rutina	24	1,53
Naringina	Hexanoato de Naringina	12	27,30
	Hexanoato de Naringina	24	13,66
	Octanoato de Naringina	12	38,40
	Octanoato de Naringina	24	28,89
	Decanoato de Naringina	12	9,22
	Decanoato de Naringina	24	4,32
	Laurato de Naringina	12	-
	Laurato de Naringina	24	-
	Oleato de Naringina	12	-
	Oleato de Naringina	24	-
Hesperidina	Hexanoato de Hesperidina	12	33,00
	Hexanoato de Hesperidina	24	31,00
	Octanoato de Hesperidina	12	44,00
	Octanoato de Hesperidina	24	44,70
	Decanoato de Hesperidina	12	23,50
	Decanoato de Hesperidina	24	24,60
	Laurato de Hesperidina	12	32,40
	Laurato de Hesperidina	24	41,90
	Oleato de Hesperidina	12	31,80
	Oleato de Hesperidina	24	64,20

TABELA 9. Concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos derivados acilados de rutina e naringina após purificação em sistema de solvente hexano/água (4:1, v/v) determinada por UHPLC-MS

Flavonoide	Ácido Graxo	Média ($\mu\text{g/mL}$ acilado)
Rutina	Ácido hexanoico	1193
	Ácido octanoico	4268
	Ácido decanoico	2313
Naringina	Ácido hexanoico	1314
	Ácido octanoico	1379
	Ácido decanoico	1565

Assim, o efeito do tamanho da cadeia carbônica na acilação de flavonoides continua sendo assunto de debate. Um estudo com AGs saturados e insaturados encontrou uma correlação entre o log P dos AGs e as taxas de conversão obtidas (VISKUPICOVA e ONDREJOVIC, 2007).

A razão molar entre os reagentes é outro fator que influencia no rendimento do produto da reação. Como a quantidade de éster formado é controlada pelo equilíbrio da reação, o excesso de um dos substratos aumenta o rendimento baseado no reagente limitante (SOLOMONS e FRYHLE, 2001).

No presente estudo, a adição de peneiras moleculares ao meio reacional levou a um aumento significativo nas taxas de biossíntese de derivados acilados de flavonoides, fato que está em conformidade com relatos da literatura (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003; MELLOU et al., 2005). O teor de água no meio reacional, em quantidade maior que a necessária para solvatar a enzima e mantê-la ativa, diminui o rendimento da reação (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003; KONTOGIANNI et al., 2003).

4.4. Coeficiente de partição dos derivados acilados de flavonoides em octanol/água

O coeficiente de partição octanol/água é um parâmetro usualmente empregado para a determinação da lipofilicidade de um composto, e desta forma, é amplamente utilizado em experimentos de absorção cutânea (XAVIER, 2006). Trata-se de uma medida da afinidade relativa de um composto pela fase aquosa ou lipídica, que permite determinar se o mesmo

será capaz de atravessar a membrana de forma passiva, por difusão, e também a forma como estará particionado na célula (RANG; DALE; RITTER, 2000).

A Tabela 10 mostra os valores dos coeficientes de partição em octanol/água (k) dos flavonoides e de seus derivados obtidos por acilação com ácido decanoico.

TABELA 10. Coeficiente de partição (k) em octanol/água dos flavonoides padrão e dos derivados acilados de rutina, hesperidina e naringina obtidos por acilação com ácido decanoico.

Flavonoide/ derivado acilado	Coeficiente de partição (k) ^a
Quercetina	1,46
Rutina	0,48
Decanoato de rutina	0,95
Hesperidina	0,42
Decanoato de hesperidina	0,83
Naringina	0,37
Decanoato de naringina	0,86

^a dados representados como médias de ensaios em triplicata.

Compostos com coeficiente de partição > 1 são mais lipofílicos, pois apresentam maior concentração na camada de octanol. Assim, pela Tabela 10, observamos que, entre os flavonoides e os derivados acilados analisados, a quercetina, que é uma forma aglicona, possui o maior coeficiente de partição e, portanto, maior lipofilicidade. O maior coeficiente de partição da quercetina no sistema octanol/água quando comparada à sua forma glicosilada, a rutina, é confirmado por Brown et al. (1998). Segundo os autores, o coeficiente de partição da quercetina é de $1,2 \pm 0,13$ e o da rutina é de $0,37 \pm 0,06$.

Os derivados biossintetizados com ácido decanoico exibiram coeficientes de partição (0,95, 0,83 e 0,86 para o decanoato de rutina, o decanoato de hesperidina e o decanoato de naringina, respectivamente) superiores aos dos flavonoides de origem (0,48, 0,42 e 0,37 para a rutina, para a hesperidina e para a naringina, respectivamente). Este fato demonstra que a reação de acilação é uma ferramenta interessante para aumentar a lipofilicidade dos flavonoides, o que poderia aumentar sua permeabilidade na membrana celular, aumentando assim sua biodisponibilidade e seu acesso a sítios-alvo celulares, e também facilitar sua aplicação industrial em sistemas lipofílicos, como cosméticos e medicamentos.

CAPÍTULO II – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FLAVONOIDES E EFEITO DA ACILAÇÃO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Efeito da acilação nas atividades biológicas dos flavonoides: aspectos gerais

Diversos estudos tem demonstrado que a introdução de moléculas lipofílicas à estrutura dos flavonoides pode modificar não somente suas propriedades físico-químicas como também suas atividades biológicas (VISKUPICOVA; ONDREJOVIC; STURDIK, 2009). O Quadro 3 fornece uma revisão atualizada das atividades biológicas de derivados lipofílicos de flavonoides biossintetizados por lipases. Essas atividades estão descritas nos itens 1.2 a 1.5 (Capítulo II).

QUADRO 3. Atividades biológicas de derivados acilados de flavonoides biossintetizados por lipases.

Continua

Flavonoide	Doador acila	Atividade biológica	Referência
Prunina	ácido láurico	↔ antioxidante	CÉLIZ e DAZ, 2011
Quercetina	grupos acila (C2 - C14)	↔ antimicrobiana, ↑ inibição da lipase, ↓ anti-HIV	GATTO et al., 2002
Rutina	ácido oleico	↑ antioxidante	KATSOURA et al., 2006
Rutina	ácidos láurico e palmítico	↑ antioxidante (oxidação da LDL), ↓ antioxidante (radicais DPPH, FRAP e quelação do ferro)	LUE et al., 2010
Isoorientina, isovitexina	ácidos láurico, mirístico e palmítico	↑ lipofilicidade, ↓ antioxidante (radicais DPPH e neutralização de radicais O ₂ ⁻)	MA et al., 2012

Continuação

Flavonoide	Doador acila	Atividade biológica	Referência
Crisoeriol-7-O-β-D-(3"-E-p-coumaroil) glucopiranosídeo, crisoeriol-7- [6"-O-acetil-β-D-alosil-(1→2)-β-D-glucopiranosídeo]	laurato de vinila	↑ antioxidante (oxidação da LDL), ↑ antibacteriana	MELLOU et al., 2005
Rutina, naringina	ácidos oleico, linolênico e linoleico, linoleato de etila	↑ antiangiogênica, ↑ anticâncer	MELLOU et al., 2006
Floridzina	Ácidos oleico, caproico, mirístico, palmítico, esteárico, cáprico e linoleico	↓ antioxidante	MILISAVLJEVIC et al., 2014
Flavonoides de <i>Citrus limetta</i>	tributirin	↑ antifúngica	MUZNA et al., 2014
Floridzina	ácidos esteárico, oleico, linoleico, linolênico, eicosapentaenoico, docosaheptaenoico	↑ anticâncer	NAIR, ZIAULLAH; RUPASINGHE, 2014
Naringina, hesperidina, neohesperidina, hesperetina glicosídeo	Butirato, decanoato e laurato	↑ antifúngica	SALAS et al., 2011
Isoquercitrina	butirato, caproato, caprilato, decanoato, laurato, palmitato, estearato e oleato de etila	↑ inibição da xantina oxidase, ↑ anticancer, ↑ antioxidante (radical ABTS), ↓ antioxidante (radicais DPPH e O ₂ ⁻)	SALEM et al., 2010
Isoramnetina-3-O-glicosídeo	butirato e laurato de etila	↑ inibição da xantina oxidase, ↑ anticâncer, ↓ antioxidante (radicais DPPH e neutralização de radicais O ₂ ⁻)	SALEM et al., 2011
Silibina	ácidos dicarboxílicos	↑ antiangiogênica, ↑ anticâncer	THEODOSIOU et al., 2011

Continuação

Flavonoide	Doador acila	Atividade biológica	Referência
Rutina	ácidos butírico, cáprico, caprílico, decanoico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico	↔antioxidante (radicais DPPH e método do β -caroteno-linoleato), ↑ lipofilicidade	VISKUPICOVA et al., 2010
Rutina	ácidos palmítico, oleico, linoleico, linolênico, araquidônico e erúxico	↑ antioxidante, ↑ inibição da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplásmico	VISKUPICOVA; MAJEKOVA; HORAKOVA, 2015
Rutina, esculina, floridzina	ácidos butírico, cáprico, caprílico, decanoico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico, araquidônico e erúxico	↑ inibição das serina proteases tripsina, trombina, elastase e uroquinase	VISKUPICOVA, ONDREJOVIC; MALIAR, 2012
Quercetina-3-O-glicosídeo	ácidos esteárico, oleico, linoleico, linolênico, eicosapentaenoico, docosaheptaenoico	↑ antioxidante (oxidação do óleo de peixe e da LDL)	WARNAKULASURIYA; ZIAULLAH; RUPASINGHE, 2014
Silibina	ácidos butírico e láurico	↑antiangiogênica, ↑anticâncer	XANTHAKIS et al., 2010
Isoorientina, isovitexina	ácido palmítico	↓ antioxidante (radicais DPPH)	XU; QIAN; LI, 2014
Epigallocatequina galato	acetato de vinila	↑ antioxidante	ZHU et al., 2014
Floridzina, isoquercitrina	ácidos oleico, esteárico, linoleico, linolênico, eicosapentaenoico e docosaheptaenoico	↑ inibição da tirosinase, ↓ antioxidante (radicais DPPH, FRAP e ORAC)	ZIAULLAH et al., 2013

Símbolos: ↑ aumento; ↓ redução; ↔ sem efeito (atividade mantida)

1.2. Atividade antioxidante

Um dos mais importantes mecanismos de ação dos flavonoides se deve às suas propriedades antioxidantes. Oxidação é o processo de transferência de elétrons de um átomo para outro, que representa uma parte essencial da vida aeróbica e do metabolismo, visto que o oxigênio é o último acceptor de elétrons no sistema de transferência de elétrons que produz energia na forma de ATP (DAVIES, 1995). Entretanto, problemas podem surgir quando o fluxo de elétrons se torna desacoplado (transferência de elétrons únicos desemparelhados), gerando radicais livres.

Exemplos de radicais livres de oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), incluem o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila (ROO^{\cdot}), alcoxila (RO^{\cdot}) e óxido nítrico (NO^{\cdot}). As rotas de formação de EROs estão ilustradas na Figura 14.

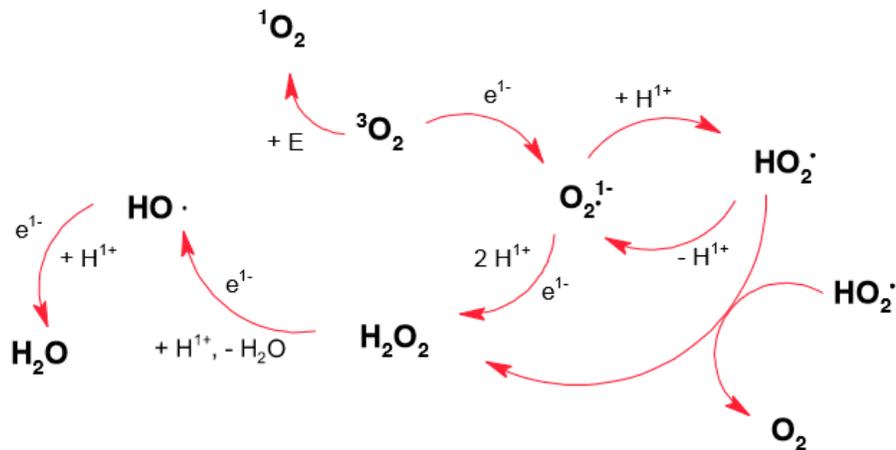


FIGURA 14. Rotas de formação das espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA, 2011).

EROs são produzidas continuamente durante eventos fisiológicos normais (GÜLÇİN, 2010). Entretanto, a existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, gerando EROs em excesso ou reduzindo a velocidade de remoção das mesmas, leva à instalação do processo de estresse oxidativo. Tal processo leva à oxidação de biomoléculas, com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). A cronicidade deste processo possui implicações relevantes sobre o processo etiológico

de diversas doenças crônicas, como aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (BARBOSA et al., 2010).

Os flavonoides podem prevenir danos causados por radicais livres através dos seguintes mecanismos: neutralização direta de EROs; ativação de enzimas antioxidantes; quelação de metais; redução de radicais α -tocoferil; inibição de oxidases; mitigação do estresse oxidativo causado pelo NO^{\bullet} e aumento da atividade de antioxidantes de baixo peso molecular (PROCHAZKOVA; BOUSOVA.; WILHELMOVA, 2011).

A estrutura química dos flavonoides apresenta três requisitos possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercida por esta classe de compostos: presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para a deslocalização dos elétrons; ligação dupla conjugada com a função 4-oxo, que aumenta deslocalização eletrônica a partir do anel B; grupos hidroxila nas posições 3'' e 5'' com função oxo, que promovem a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (CROFT, 2006) (Figura 15). A OH na posição 3'' é o principal fator responsável pela reatividade do flavonoide com oxigênio singlete (TOURNAIRE et al., 1993). O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula contribui de forma significativa para a atividade antioxidante destes compostos (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

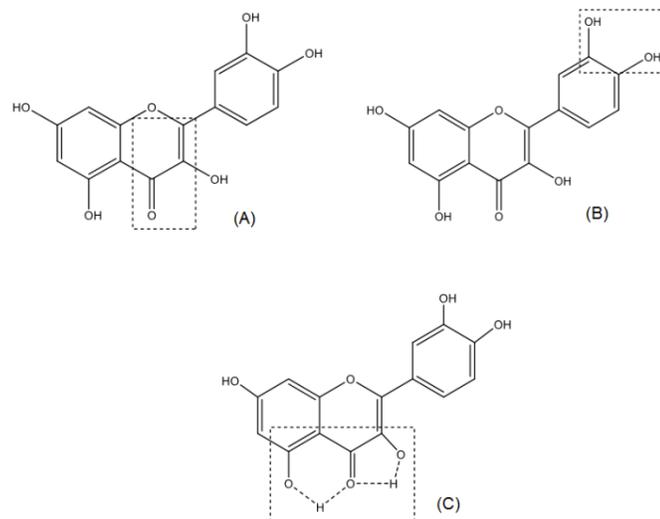


FIGURA 15. Requisitos responsáveis pela atividade de neutralização de radicais dos flavonoides. (A) ligação dupla 2,3 conjugada com a função 4-oxo no anel B; (B) grupo orto-dihidroxi (catecol) no anel B; (C) grupos OH nas posições 3'' e 5'' do anel A (adaptada de CROFT, 2006)

Estudos indicam que a acilação de flavonoides com moléculas alifáticas ou aromáticas, como ácidos graxos ou seus ésteres, pode alterar a atividade antioxidante desses compostos devido a alterações na lipofilicidade da molécula promovidas pela adição de cadeias lipofílicas. Como pode ser visto no Quadro 3, existe uma heterogeneidade de resultados em relação à atividade antioxidante dos derivados acilados de flavonoides, sugerindo que, além do aumento da lipofilicidade, outros mecanismos, relacionados com a estrutura do doador acila (por exemplo, presença de ligações insaturadas), podem também influenciar as propriedades antioxidantes desses compostos após a reação de acilação.

1.3. Atividade antiproliferativa

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se, através do processo de metástase, para outras regiões do corpo (INCA, 2016). Devido à rápida divisão celular, essas células apresentam um caráter altamente agressivo e incontrolável, o que leva a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas.

A quimioterapia é um dos métodos mais empregados para o tratamento do câncer, consistindo na utilização de compostos químicos, denominados quimioterápicos. Um dos grandes problemas dos medicamentos quimioterápicos é a sua não especificidade para células tumorais, sendo também tóxicos para células normais. Problemas relacionados à ineficiência dos fármacos existentes frente a diferentes tipos de câncer, bem como o aumento do aparecimento de linhagens resistentes a estes medicamentos, são também relatados (CHABNER e ROBERTS, 2005). Desta forma, a busca por novos quimioterápicos para o tratamento do câncer continua despertando grande interesse.

Os flavonoides são reconhecidos como agentes quimiopreventivos e inibidores da progressão de tumores (WANG et al., 2005). Entre os potenciais efeitos antitumorais de flavonoides isolados e de extratos vegetais contendo essa classe de compostos, destacam-se a atividade antiproliferativa, a suspensão do ciclo celular de linhagens tumorais e/ou a indução da apoptose através de sua atividade pró-oxidante (LOA; CHOW; ZHANG, 2009; WANG et al., 2005), através de mecanismos que podem incluir a modificação de enzimas que ativam ou detoxificam carcinógenos, como o sistema P-450 e a alteração de vias de sinalização celular

(MOON et al., 2006b), além da inibição de enzimas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio, como a lipoxigenase, que induz a oxidação da LDL e está, desta forma, implicada na progressão da aterosclerose e do câncer (MADESWARAN et al., 2011), e a xantina oxidase (XO) (COS et al., 1998; COTELLE et al., 1996; LIN et al., 2002).

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

Alguns flavonoides, como a quercetina, são capazes de inibir a ácido graxo sintetase, enzima responsável pela síntese de AGs de cadeia longa, que se apresenta em níveis muito elevados em diversos tumores, como próstata, mama, ovário, endométrio, cólon e pulmão (BRUSSELMANS et al., 2005). Após 5 horas de exposição à quercetina em baixa concentração (6 μ M), a síntese lipídica em células da linhagem LNCaP (tumor de próstata) e MDA-MB 231 (mama) foi marcadamente reduzida, de forma dose-dependente. As células tumorais tratadas apresentaram alterações na estrutura da membrana, inibição da proliferação e indução da apoptose via expressão de caspases. Além disso, estudos em fibroblastos normais mostraram que a quercetina não afetou a proliferação ou a viabilidade dessas células. A presença de uma dupla ligação na posição C2-C3, um grupo funcional 4-cetona e grupos OH nas posições 5, 7, 3' e 4' na estrutura dos flavonoides foram apontados como responsáveis pela inibição da lipogênese (BRUSSELMANS et al., 2005).

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

Estudos indicam que a acilação de flavonoides é capaz de melhorar suas propriedades antiproliferativas e antitumorais. A melhora da atividade antiproliferativa após acilação catalisada pela CALB foi relatada para a isoramnetina-3-O-glicosídeo em células CaCo-2 (adenocarcinoma colorretal) (SALEM et al., 2011); para a isoquercetina, também em células CaCo-2 (SALEM et al., 2010); para a silibina, em células K562 (leucemia mieloide crônica)

(THEODOSIOU et al., 2011) e para a floridzina em células HepG2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB 231 (adenocarcinoma de mama) e THP-1 (leucemia monocítica aguda) (NAIR; ZIAULLAH; RUPASINGHE, 2014).

Além da melhora da atividade antiproliferativa, a acilação de flavonoides também é capaz de melhorar suas propriedades antiangiogênicas. O aumento na capacidade de inibir a secreção de VEGF por células da linhagem K562 foi relatado para a acilação da rutina (MELLOU et al., 2006; XANTHAKIS et al., 2010) e da naringina (MELLOU et al., 2006).

1.4. Atividade antimicrobiana

Produtos naturais têm sido fontes importantes de agentes antimicrobianos, levando à descoberta, por exemplo, da penicilina nos anos 1940, das tetraciclinas em 1948 e dos glicopeptídeos em 1955 (TERESCHUK et al., 1997). Entre os flavonoides com atividade microbiana descrita na literatura, podemos destacar:

- Flavonas e seus glicosídeos: acacetina, apigenina, baicalina, baicaleína, crisina, gardenina A, genkwanina, luteolina, luteolina-7-glicosídeo;

- Isoflavonas: 6,8-diprenilgenisteína, soforaisoflavona A;

- Flavonois e seus glicosídeos: galangina, kaempferol, morina, miricetina, quercetagetina, quercetina, quercetina-3-glicosídeo, robinetina, rutina;

- Flavan-3-óis: catequina, epicatequina galato, epigallocatequina, epigallocatequina galato;

- Flavanon-3-óis: dihidrofisetina, dihidroquercetina;

- Flavanonas e seus glicosídeos: naringenina, naringina, pinocembrina, ponciretina, soforaflavanona G;

- Chalconas: licochalcona A, licochalcona C;

- Flavan-3,4-dióis e antocianinas: leucocianidina, pelargonidina clorada;

- Flavanas: 6,4'-dicloroflavana, 7-hidroxi-3',4'-(metilenodioxo) flavana (CUSHNIE e LAMB, 2005).

O Quadro 4 apresenta um resumo de trabalhos encontrados na literatura relatando a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ricos em flavonoides.

QUADRO 4. Relatos da literatura sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ricos em flavonoides e flavonoides isolados.

Continua

Flavonoide/extrato vegetal	Micro-organismos	Método	Referência
<i>Gossipium</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trichoderma viride</i>	Ensaio de difusão em discos de papel	CHATURVEDI; SINGH; NAG, 2010
<i>Laminaria digitata</i> , <i>Laminaria saccharina</i> , <i>Himanthalia elongata</i> , <i>Palmaria palmata</i> , <i>Chondrus crispus</i> e <i>Enteromorpha spirulina</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella abony</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio de MIC em placas de 96 poços	COX; ABU-GHANNAM; GUPTA, 2010
<i>Haloxylon salicornicum</i> , <i>Haloxylon recurvum</i> e <i>Salsola baryosma</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	Ensaio de difusão em discos de papel	KAUR; BAINS, 2012
Criseoeriol e criseoeriol acilado enzimaticamente (extrato de <i>Stachys swainsonii</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>	Ensaio de MIC em placas de 96 poços	MELLOU et al., 2005

Continuação

Flavonoide/extrato vegetal	Micro-organismos	Método	Referência
<i>Memecylon umbellatum</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i>	Poços no meio de cultura	MURUGESAN; PANNERSELVA M; TANGAVELOU, 2011
Quercetina, apigenina, luteolina, naringenina, eriodictiol, rutina, catequina, epicatequina (<i>Capparis spinosa</i> , <i>Castanea vulgaris</i> , <i>Geranium purpureum</i> , <i>Nepeta cataria</i> , <i>Origanum dictamnus</i> , <i>Spartium funceum</i> , <i>Jasminum officinalis</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Humulus lupulus</i> , <i>Urtica dioica</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Bacillus cereus</i>	Ensaio de difusão em discos de papel	PROESTOS et al., 2006
Kaempferol, quercetina, quercetina 3-O- α -ramnosídeo, kaempferol 3-O- β -glucosídeo, miricetina-3-O- β -glucosídeo, rutina (<i>Bauhinia racemosa</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i>	Ensaio de MIC* em placas de 96 poços	RASHED; BUTNARIU, 2014
Pinocembrina (<i>Piper lanceaefolium</i>)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (26 cepas)	Ensaio de difusão em discos de papel	RUDDOCK et al., 2011

Continuação

Flavonoide/extrato vegetal	Micro-organismos	Método	Referência
<i>Pongamia pinnata</i> e <i>Vitex negundo</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Trichoderma viride</i>	Ensaio de difusão em discos de papel	SHARMA et al., 2011
Silimarina (<i>Sylibum marianum</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Poços no meio de cultura	SHAH et al., 2011
<i>Bixa orellana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Vibrio cholera</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Brucella sp.</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	Ensaio de difusão em discos de papel	TAMIL et al., 2011
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	Poços no meio de cultura	VATS et al., 2012

Estudos recentes identificaram várias características estruturais capazes de melhorar as propriedades antibacterianas de flavonoides. A acilação do grupo OH reativo da molécula do flavonoide pode estabilizar a função fenol e aumentar a lipofilicidade do composto, melhorando sua atividade antimicrobiana.

A acilação do crisoeriol catalisada pela CALB foi capaz de aumentar a atividade de inibição do flavonoide para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Esse efeito foi atribuído ao aumento na lipofilicidade da molécula, visto que a adição de uma cadeia hidrofóbica é capaz de aumentar sua capacidade de interação com a membrana celular e sua permeabilidade na mesma, resultando em maior atividade antimicrobiana (MELLOU et al., 2005). Entretanto, a acilação da quercetina com lipase comercial de *Mucor miehei* não alterou a atividade antimicrobiana nas linhagens bacterianas estudadas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria ivanovi*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria serligeri*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella tiphymurium*), utilizando concentrações de até 100 µg/mL (GATTO et al., 2002).

Adicionalmente, a atividade antimicrobiana *in vivo* de determinadas substâncias naturais poderia ser atribuída à sua capacidade de interferir em fatores de virulência. Um estudo descreveu uma atividade de inibição da lipase de *Cândida rugosa* para os derivados acilados de quercetina, com um valor de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) de $1,8 \times 10^{-4}$ para 3-O-acilquercetina. *In vivo*, esta inibição poderia desempenhar um papel importante contra microorganismos que produzem lipase. O estudo também confirmou a atividade anti-HIV da quercetina (inibição de 80% a 40 mM), a qual parece depender da OH livre na posição C-3 (GATTO et al., 2002).

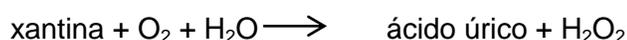
Um estudo sobre a atividade antifúngica de quatro flavonoides isolados a partir de frutos cítricos e de seus derivados acilados mostrou que os derivados inibiram de forma mais eficaz, em relação aos compostos originais, o crescimento dos micromicetos contaminantes de alimentos *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium semitectum* e *Penicillium expansum* (SALAS et al., 2011).

A acilação de flavonoides de *Citrus limetta* catalisada por lipase aumentou em 56,2% a zona de inibição de *Candida albicans*, em comparação com o controle. A zona de inibição para a amostra tratada foi significativamente maior do que a do fluconazol (MUZNA et al., 2014). Flavonoides enzimaticamente modificados podem servir como substitutos naturais para combater infecções por *Candida* resistentes ao fluconazol (HARMALKAR et al., 2013).

1.5. Modulação enzimática

Atualmente, a literatura sugere que os flavonoides tem a capacidade de inibir seletivamente uma vasta gama de enzimas. Evidências também indicam que o grau de lipofilicidade desempenha um papel importante nas atividades desses compostos como inibidores enzimáticos.

A **xantina oxidase (XO)** é uma enzima envolvida no metabolismo de purinas, que catalisa a oxidação da hipoxantina e da xantina em ácido úrico, gerando radicais O_2^- , que promovem danos oxidativos em tecidos e estão, desta forma, envolvidos em processos como inflamação, aterosclerose, câncer e envelhecimento (PARAVICIN e TOUYZ, 2008). Durante a reoxidação da XO, o O_2 molecular age como acceptor de elétrons, produzindo radicais O_2^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme representado abaixo (COS et al., 1998):



Uma das conseqüências desse processo é uma condição inflamatória conhecida como gota, caracterizada por depósitos de cristais de urato de sódio, denominados tofos, nos tecidos, especialmente articulações. Danos relacionados à reperfusão em tecidos isquêmicos, caracterizados pela superprodução de íons O_2^- , também estão associados à atividade da XO (COTELLE et al., 1996).

O alopurinol, um potente inibidor da XO utilizado na terapia de pacientes com hiperuricemia, pode ocasionar efeitos adversos caracterizados por múltiplas alterações, tais como febre, erupções cutâneas, prejuízo da função renal, injúria hepatocelular, leucocitose e eosinofilia (CHEN et al., 2005). Desta forma, se faz necessária a busca por novos inibidores da XO que demonstrem eficácia comparável à do alopurinol, porém com efeitos adversos menos significativos. Sob tal perspectiva, os flavonoides representam uma alternativa promissora.

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

Lin et al. (2002) estudaram, através de modelagem molecular, a capacidade de inibição da XO por diversos flavonoides. Os autores relataram que todos os compostos investigados se comportaram como inibidores competitivos da enzima. A apigenina foi o inibidor mais eficiente,

tendo demonstrado a interação flavonoide-sítio ativo da enzima mais favorável, e os flavonoides com atividade inibitória mais baixa foram aqueles que possuíam maiores resíduos glicosídicos, como a isovitexina.

Rao et al. (2003) reportaram que a biossíntese de derivados acilados do mesquitol utilizando CALB resultou no aumento da inibição de enzimas oxidativas, entre elas a XO. A acilação da isoramnetina-3-O-glicosídeo extraída de *Nitraria retusa* com laurato de etila e butirato de etila, utilizando CALB, aumentou a capacidade inibitória do composto sobre a XO, embora tenha havido um decréscimo em seu potencial de neutralização de radicais (SALEM et al., 2011).

A Tabela 11 traz os resultados (IC_{50}) de um estudo sobre a relação estrutura-atividade inibitória da XO de alguns flavonoides, representados como IC_{50} . A substituição di-OH nas posições 5 e 7, simultaneamente à presença de dupla ligação entre C-2 e C-3 (requisitos presentes em flavonas, como a apigenina e a luteolina, e em flavonóis, como o kaempferol e a quercetina, conforme mostrado na Figura 2), são essenciais para a alta atividade de inibição da XO (COS et al., 1998).

TABELA 11. Relação entre a estrutura de flavonoides e seu potencial de inibição da xantina oxidase (IC_{50}) (adaptado de COS et al., 1998).

Nome sistemático	Classe	Posição dos OH	IC_{50} (μ M)
catequina	catequina	3, 5, 7, 5'	> 100
epigalocatequina	catequina	3, 5, 7, 5'	> 100
naringenina	flavanona	7	> 50
4'-hidroxiflavanona	flavanona	4	> 30
kaempferol	flavonol	3, 5, 7, 4'	2,5
quercetina	flavonol	3, 5, 7, 3', 4'	1,5
apigenina	flavona	5, 7, 4'	1,0
luteolina	flavona	5, 7, 3', 4'	0,75

A **mieloperoxidase** (MPO) é uma enzima sintetizada durante a diferenciação mielóide na medula óssea, presente no interior dos grânulos primários azurófilos de neutrófilos e monócitos

(ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2007) e em seu sítio ativo apresenta uma molécula de íon férrico, sendo esta forma denominada forma férrica da MPO [MPO-Fe(III)]. A MPO aumenta a eficiência da ação de neutrófilos contra agentes microbianos, produzindo ácido hipocloroso (HOCl) através da utilização de íons cloreto (Cl^-) e H_2O_2 oriundos da ação da superóxido dismutase (SOD) sobre o O_2^- proveniente da NADPH oxidase. Além de sua função na eliminação de patógenos, a MPO está envolvida em inúmeros processos inflamatórios, promovendo ativação e inativação de proteínas secretadas pelos neutrófilos, inativação de toxinas e de mediadores inflamatórios (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2007).

O mecanismo de ação da MPO (Figura 16) tem como primeira etapa a reação da MPO-Fe(III) (forma nativa) com H_2O_2 , formando um intermediário redox (composto I, MPO I) que promove a oxidação dos íons Cl^- , Br^- e I^- , entre outros. A MPO também é capaz de oxidar substratos orgânicos, como os fenóis, através de transferências sucessivas de um elétron envolvendo os compostos MPO I e MPO II (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998). A MPO-Fe(III) reage de forma rápida e reversível com H_2O_2 , formando MPO I, que oxida haletos através de uma transferência sucessiva de 2 elétrons, formando seus ácidos. A MPO-Fe(III) (nativa) pode ser reduzida gerando um intermediário inativo, a MPO-Fe(II). O composto III é formado pela ligação do O_2^- à MPO-Fe(III) ou pela ligação do oxigênio à MPO-Fe(II). O NO^\bullet reage com o ferro central de hemoproteínas, ligando-se às formas Fe-III e Fe-II da MPO para gerar complexos estáveis. Em baixas concentrações, o NO^\bullet se liga à forma Fe-II da MPO, aumentando a atividade da enzima. Em altas concentrações, o NO^\bullet forma um complexo com a MPO-Fe(III), inativando-a.

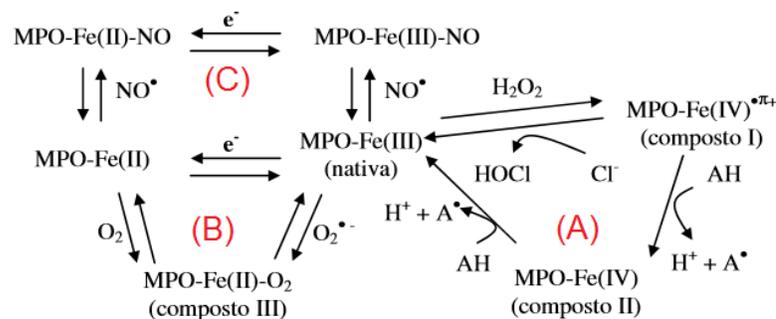


FIGURA 16. Mecanismo de ação da mieloperoxidase (MPO). (A) ciclo peroxidásico clássico; (B) reação do grupo heme com O_2 ; (C) ligação do NO^\bullet / modulação da atividade (ABU-SOUD e HAZEN, 2000)

Um estudo demonstrou que a miricetina foi prontamente oxidada pela MPO na presença de H_2O_2 e, na presença de glutatona, formou uma hidroquinona conjugada à glutatona, levando à inativação irreversível da MPO. O número de grupos OH no anel B do flavonoide e a presença de um grupo OH meta-fenólico no anel A tiveram papel relevante na inibição da MPO (MEOTTI et al., 2008).

Estudos confirmam a atividade de inibição da MPO pela quercetina e pela rutina (PINCEMAIL et al., 1988). Análises espectrométricas indicaram a capacidade da quercetina de atuar como co-substrato da MPO, resultando na formação de quercetina oxidada. Estudos de estrutura-atividade quantitativos mostraram que a ação inibitória dos flavonoides depende não somente de sua atividade de neutralização de radicais como também de sua lipofilicidade (log P). A combinação de grupos OH nas posições 3, 5 e 4', além de uma dupla ligação entre C2 e C3 do flavonoide, foram apontadas como responsáveis pelo seu efeito de inibição da atividade da MPO (SHIBA et al., 2008).

A **lipase pancreática** desempenha um papel chave na absorção de triacilgliceróis no intestino delgado. Essa enzima é secretada pelo pâncreas e hidrolisa os triacilgliceróis em glicerol e AG. Assim, inibidores da lipase pancreática são considerados importantes agentes terapêuticos no tratamento da obesidade induzida pela dieta. O sucesso no emprego do orlistat, um inibidor específico da lipase pancreática, levou a um interesse na pesquisa de novos inibidores da lipase pancreática derivados de fontes naturais (LEE et al., 2010).

Um estudo demonstrou que a capacidade de inibição da lipase pancreática pelos flavonoides depende do número e da posição das OH fenólicas na molécula desses compostos (BUCHHOLZ; MELZIG, 2015).

Flavonas C-glicosídicas isoladas de extratos metanólicos de *Eremochloa ophiuroides* demonstraram alta atividade de inibição da lipase pancreática porcina (IC_{50} entre 18,5 e 50,5 μM) (LEE et al., 2010). A hesperidina e a neohesperidina isoladas da casca de *Citrus unshiu* mostraram capacidade de inibição dessa enzima ($IC_{50} = 32,0 \mu g/mL$ e $46,0 \mu g/mL$, respectivamente); entretanto, a narirutina e a naringina isoladas da mesma fonte não demonstraram tal atividade (KAWAGUCHI et al., 1997).

Entre os flavonoides isolados de *Cassia auriculata*, o kaempferol-3-O-rutinosídeo demonstrou a maior atividade de inibição da lipase pancreática ($IC_{50} = 2,9 \mu M$), enquanto a rutina, a quercetina e a luteolina mostraram baixa capacidade de inibição ($IC_{50} > 100 \mu M$) (LUNAGARIYA et al., 2014). Alta atividade de inibição da lipase pancreática também foi observada para as proantocianidinas (SUGIYAMA et al., 2007).

Estudos demonstram a atividade de inibição da lipase pancreática pelo chá verde, com valores de IC_{50} de 25 $\mu\text{g/mL}$ quando utilizadas infusões em água quente do extrato (GONDOIN et al., 2010). O polifenol mais abundante no chá verde é a epigallocatequina galato (BOSE et al., 2008).

Padrões de flavonoides foram analisados com o objetivo de elucidar o mecanismo cinético da inibição da lipase pancreática. Somente a epigallocatequina e a epigallocatequina galato demonstraram alto potencial de inibição da enzima ($IC_{50} = 237,3$ e $391,2 \mu\text{M}$, respectivamente), comportando-se como inibidores competitivos e de forma dose-dependente, sendo que a estrutura galoil teve papel relevante nessa atividade (RAHIM; TAKAHASI; YAMAKI, 2015). Entretanto, poucos relatos até o momento investigaram o mecanismo de inibição da lipase pancreática pelos flavonoides, e mesmo esses relatos apresentaram resultados conflitantes (RAHIM; TAKAHASI; YAMAKI, 2015). Assim, são necessários mais estudos com o objetivo de elucidar tal mecanismo de inibição, as estruturas que o promovem e também uma possível influência do processo de acilação dos flavonoides em sua capacidade de modular a atividade da lipase pancreática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da reação de acilação nas atividades biológicas *in vitro* dos flavonoides a fim de obter derivados acilados de interesse para aplicações industriais e terapêuticas.

2.2. Objetivos específicos

Investigar a bioatividade *in vitro* dos novos derivados acilados de flavonoides (rutina, naringina e hesperidina) e dos compostos de origem na:

- Atividade antioxidante, através do método DPPH;
- Atividade antiproliferativa em cultura de células, através de painel contendo dez linhagens tumorais e duas linhagens não tumorais, pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT);

- Atividade antimicrobiana, através de ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) em quatro linhagens bacterianas e uma linhagem fúngica;
- Modulação enzimática, utilizando ensaios de cinética de inibição da XO, estudo dos parâmetros cinéticos de inibição e ensaios de inibição da mieloperoxidase em neutrófilos de sangue periférico humano e inibição da lipase pancreática porcina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH)

O DPPH é um radical estável, disponível comercialmente, muito utilizado para determinar a atividade antioxidante de flavonoides presentes em bebidas e alimentos. Nesse teste, a amostra é incubada juntamente com uma solução metanólica de DPPH, de coloração roxo escura, e a reação é monitorada em espectrofotômetro em comprimento de onda próximo a 515 nm. A ação de neutralização do radical DPPH, envolvendo a transferência de H⁺, ocasiona uma descoloração da solução, levando ao decréscimo da absorvância da amostra de acordo com o número de elétrons capturados, isto é, a mudança de cor acontece quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um H⁺ proveniente do composto antioxidante (VILA, 2006).

No presente estudo, foi utilizada uma solução metanólica de DPPH de concentração 40 mg/L (750 µL), posteriormente acrescentada a 120 µL de solução das amostras de flavonoides padrão e de seus derivados acilados, preparadas em tampão acetato 0,3 M pH 3,8 (0,75 mg do composto/mL) ou, no caso do controle, a 120 µL de metanol. As misturas foram incubadas a 25°C por 25 minutos e a absorvância foi determinada em leitor de ELISA (Epoch Biotek) a 517 nm. Uma solução de rutina em tampão acetato 0,3 M pH 3,8 (0,75 mg/mL) foi utilizada para calibrar o equipamento. A capacidade de sequestro do radical DPPH foi calculada usando a seguinte equação:

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

onde *Absc* e *Absam* são os valores de absorvância do controle e das amostras teste, respectivamente.

3.2. Determinação da atividade antiproliferativa pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT)

O método colorimétrico MTT, descrito por MOSMANN (1983), consiste em avaliar indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

A suspensão celular foi preparada em meio RPMI-1640 (Gibco®) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA) e 1% (v/v) de solução de penicilina:estreptomicina (Nutricell®, Campinas, 1000 U mL⁻¹:1000 g mL⁻¹) e ajustada em densidades de inoculação de 5000 células/poço. Foram inoculados 100 µl de suspensão celular em placas de 96 compartimentos (Corning®, EUA), posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi também preparada uma placa controle (placa T0), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento, que estão descritas na Tabela 12.

TABELA 12. Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença
U251	SNC; glioma
MCF7	Mama; adecarcinoma
NCI-ADR/RES ^a	Ovário; adenocarcinoma
786-0	Rim; adenocarcinoma
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células
PC-3	Próstata; adenocarcinoma
HT-29	Cólon; adenocarcinoma
HaCat	Queratinócito normal imortalizado

^aLinhagem resistente a múltiplos fármacos.

As amostras foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich®, Alemanha) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas, de forma que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 0,1%, evitando, assim, sua toxicidade. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 1,6-100 µg/mL, (100 µL/compartimento) em triplicata, e a seguir incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorubicina (Eurofarma, Brasil).

As células inoculadas na placa controle T0 foram coradas com MTT (Sigma-Aldrich®, EUA) para determinação da quantidade de células presentes no momento de adição das amostras, sendo este o valor basal 0. Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram coradas com MTT e foi descontado o valor basal 0. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 570 nm em leitor de microplacas.

As médias das absorbâncias das células tratadas (TA) foram calculadas descontando-se o valor de absorbância de seu controle DMSO (T1) e, através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se $TA > T1$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T1 \geq TA > T0$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(TA - T0)/(T1 - T0)]$.

Se $TA < T0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(TA - T0)/(T0)]$.

Os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do *software* Origin (OriginLab), foi feita a regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e calculado o IC_{50} , utilizado para amostras citostáticas. Esse parâmetro foi utilizado para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade das mesmas.

3.3. Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana dos flavonoides padrão e de seus derivados obtidos por acilação enzimática foi determinada através de ensaios de MIC (concentração inibitória mínima) utilizando os microrganismos a seguir: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente em solução salina (0,85%), sendo a densidade ótica (DO) padronizada a 625 nm (bactérias) ou 530 nm para *Candida albicans* (absorbância entre 0,08 e 0,1).

Em uma microplaca esterilizada com 96 poços foram depositados 100 μ L de meio de cultura por poço. A partir de soluções-estoque dos flavonoides e de seus derivados acilados (8

mg/mL), foram realizadas diluições seriadas, sendo 2 mg/mL a concentração máxima testada. Os antibióticos empregados foram a nistatina para *C. albicans* e cloranfenicol para as linhagens bacterianas. A cada poço foram acrescentados 100 µL de inóculo de microrganismo. As placas seladas foram incubadas em estufa por 24-48 h a 36°C e a leitura dos resultados foi efetuada.

3.4. Determinação da atividade de modulação enzimática

3.4.1. Atividade da xantina oxidase (XO)

A capacidade de inibição da atividade da XO foi determinada para os flavonoides padrão (rutina, naringina e hesperidina) e seus derivados biossintetizados através de acilação catalisada pela CALB.

A determinação foi feita através da mensuração da formação de ácido úrico a partir do substrato xantina. Soluções de xantina em diversas concentrações (250, 500 e 750 µM) preparadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foram incubadas com 100 µL de etanol e com o mesmo volume das amostras teste em diferentes concentrações (45 e 90 µM preparadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4). As amostras foram pré-incubadas a 37°C por 10 minutos. A solução de XO (0,3 mL a 0,1 U/mL) foi acrescentada à mistura de reação e os frascos incubados a 37°C por 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µL de HCl 3,2%. A absorbância das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Epoch Biotek) a 290 nm. Soluções de cada amostra-teste foram utilizadas como branco para a calibração do equipamento. O controle foi composto de uma solução contendo xantina e XO. Como controle positivo, foram utilizadas soluções de alopurinol nas mesmas concentrações das amostras-teste. A inibição da XO (XOI, %) foi calculada como segue:

$$XOI (\%) = \left(1 - \frac{Abs_{sam}}{Abs_{sc}} \right) \times 100$$

onde *Abs_{sc}* e *Abs_{sam}* são os valores de absorbância para a reação controle e para as amostras teste, respectivamente. As determinações foram realizadas em duplicata.

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados com os compostos que produziram uma maior inibição da XO. Com base nos valores de XOI (%) obtidos para os inibidores foi interpolado o gráfico XOI (%) *versus* concentração de inibidor (mM) e através das equações das retas fornecidas, comparadas a uma linha de tendência linear, foram calculados os valores de

IC₅₀. Para cada equação fornecida nas retas do gráfico, foram estabelecidos os cálculos para determinação de x, considerando y = 50 (IC₅₀). Foram calculados também os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_{máx} (velocidade máxima) e determinado o tipo de cinética de inibição, com auxílio do programa Origin 8.6, utilizando o modelo de hipérbole retangular. A velocidade das reações (expressa como concentração de ácido úrico μmol/min) foi calculada a partir da curva padrão do ácido úrico (y=0,024x-0,1242, R²= 0,9786), mostrada no Apêndice VI.

3.4.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO)

O procedimento para dosagem da MPO em neutrófilos de sangue periférico seguiu o método descrito por Bradley et al. (1982) com modificações. O sangue foi coletado de voluntários sadios, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade São Leopoldo Mandic (Campinas/SP) de acordo com a Declaração de Helsinki (parecer nº 917.360, CAAE 39003314.1.0000.5374).

O volume de 40 mL de sangue foi disposto sobre Ficoll-Histopaque, de densidades de 1.077 (10 mL) e 1.119 g/L (10 mL), em tubo de 50 mL. Após centrifugação de 30 min a 700 x g, 20°C, a camada de polimorfonucleares situada entre as fases de 1 077 e 1 119 foi lavada em RPMI 1640. As hemácias foram lisadas com o tampão de lise e as células lavadas. A contagem total foi efetuada em câmara de Neubauer e lâminas da suspensão celular foram confeccionadas em citocentrífuga para a contagem diferencial. A viabilidade celular foi feita utilizando a técnica de azul de Trypan.

As células foram ressuspensas em RPMI 1640 na concentração de 2x10⁶ células/mL e incubadas por 20 minutos em estufa, a 37°C e 5% de CO₂, com os flavanoides quercetina, rutina, naringina e hesperidina e com os derivados acilados de rutina, naringina e hesperidina com ácido decanoico. As concentrações das amostras utilizadas foram de 2,5 e 5,0 μg/mL. Logo após a incubação, 29 μL de cada concentração foram transferidos para placa de 96 poços. Após a adição de 14,5 μL de solução de brometo de hexa trimetil amônio (HTAB) a mistura foi mantida a - 20°C por uma noite antes da quantificação da MPO.

Para quantificação da MPO, as células foram descongeladas e 10 μL da amostra foram transferidos para outra placa de 96 poços, onde foram acrescidos 180 μL do reagente de MPO.

Logo em seguida a placa foi colocada em um leitor de microplacas (VersaMax). A leitura cinética foi configurada para 460nm, por 15 minutos, com intervalos de 1 minuto e 30 segundos.

O resultado em unidades de MPO (UMPO) considera que 1 UMPO corresponde à quantidade de enzima que degrada 1 μmol de H_2O_2 em H_2O e O^- por minuto a 25°C , o que gera uma variação de 0,0113 unidades de absorbância (BRADLEY et al., 1982).

3.4.3. Atividade da lipase pancreática porcina

A atividade inicial da lipase pancreática porcina foi determinada usando o p -nitrofenil palmitato (p -NPP) como substrato, através do método previamente descrito por Winkler et al. (1979).

Uma solução estoque de lipase pancreática porcina (5 mg/mL) foi preparada em tampão fosfato de potássio (1 mM, pH 7,2). Para determinar a atividade de inibição da lipase pancreática, os flavonoides padrão, os derivados acilados de flavonoides obtidos por acilação catalisada pela CALB e o orlistat (inibidor padrão da lipase), nas concentrações de 0 (controle), 75, 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$ (em tampão fosfato de potássio 1 mM, pH 7,2), foram pré-incubados com 20 μL de solução de lipase pancreática durante 30 minutos, a 37°C . Após a pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de 40 μL de p -NPP como substrato (10 mM) (volume final da reação de 200 μL) e os ensaios foram incubados a 37°C por 5 minutos. A concentração de p -nitrofenol produzida a partir do p -nitrofenil palmitato foi determinada através de leitura em leitor de ELISA (Epoch Biotek) a 405 nm. A atividade de inibição da lipase pancreática pelas amostras foi calculada com base em uma curva padrão do p -nitrofenol e expressa como concentração de p -nitrofenol produzida (em μmol) (Apêndice VII).

3.5. Análise estatística

Os ensaios de determinação da atividade antioxidante (item 3.1), atividade antimicrobiana (item 3.3) e modulação enzimática (item 3.4) foram realizados em triplicata. A significância estatística dos resultados foi acessada através de análise de variância (ANOVA), e as diferenças identificadas foram analisadas através de teste t de Student não pareado,

utilizando o software OriginPro8 (OriginLab). Consideraram-se como estatisticamente significativas as diferenças cujo p-valor fosse inferior ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antioxidante

A Figura 17 ilustra os resultados da atividade de sequestro de radicais DPPH dos flavonoides padrão (naringina, hesperidina e rutina) e seus derivados acilados obtidos por acilação catalisada pela CALB.

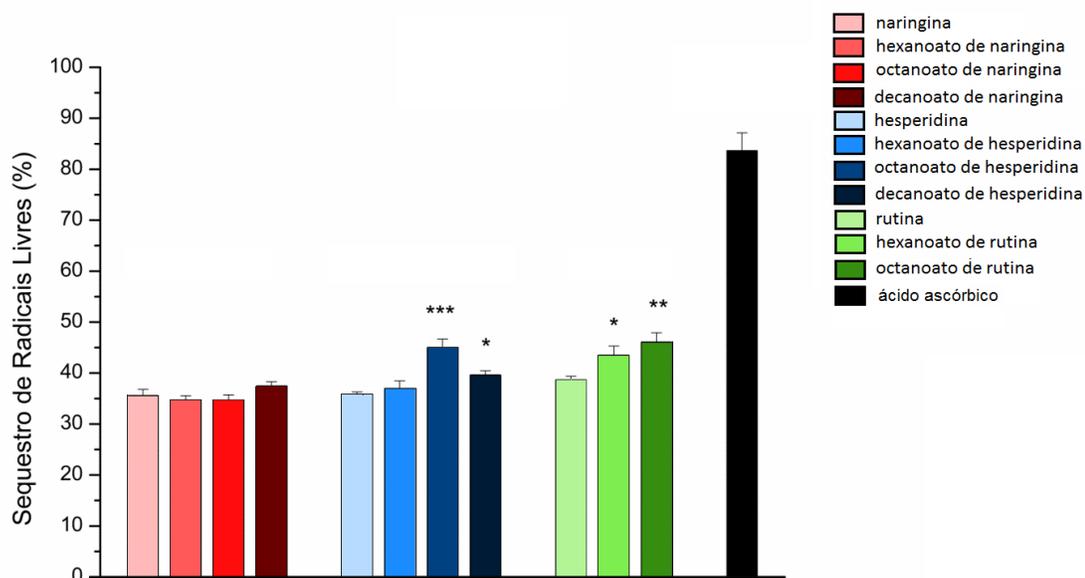


FIGURA 17. Atividade antioxidante (sequestro de radicais DPPH, %) de soluções a 0,75 mg/mL de naringina padrão (A), de seus derivados acilados hexanoato de naringina (B), octanoato de naringina (C) e decanoato de naringina (D), da hesperidina padrão (E), de seus derivados acilados hexanoato de hesperidina (F), octanoato de hesperidina (G) e decanoato de hesperidina (H), da rutina padrão (I), de seus derivados acilados hexanoato de rutina (J), octanoato de rutina (K) e do padrão de ácido ascórbico (L). * p < 0,05 ** p < 0,01, *** p < 0,001 em comparação com o flavonoide padrão de cada grupo.

Os resultados de atividade antioxidante para a naringina padrão e para a hesperidina padrão se mostraram equivalentes, contrariamente a relatos da literatura segundo os quais

apesar das estruturas de ambas as flavanonas serem similares, sua atividade antioxidante é significativamente diferente, com valores de $0,032 \pm 0,001$ para a naringina e $1,69 \pm 0,3 \mu\text{mol Fe}^{2+} \mu\text{mol}^{-1}$ para a hesperidina obtidos pelo método FRAP (GORINSTEIN et al., 2006). Essa diferença entre os resultados pode ser explicada pela diferença entre os métodos utilizados. O método DPPH, empregado no presente estudo, é baseado no sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril hidrazila, com a transferência de um H^+ proveniente do composto antioxidante para o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio do DPPH (VILA, 2006), Já o método FRAP se baseia na capacidade do composto em análise de reduzir o Fe(III) a Fe(II) (RUFINO et al., 2006). No presente estudo, os resultados encontrados para a rutina padrão também se mostraram equiparáveis aos das flavanonas (Figura 17).

Como pode ser visto na Figura 17, a reação de acilação foi capaz de aumentar a atividade antioxidante dos derivados acilados da hesperidina e da rutina: octanoato de hesperidina ($p < 0,001$), decanoato de hesperidina ($p < 0,05$), hexanoato de rutina ($p < 0,05$) e octanoato de rutina ($p < 0,01$). Para a naringina, entretanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade de sequestro de radicais DPPH antes e após acilação enzimática.

A influência da reação de acilação na atividade antioxidante dos flavonoides ainda não se encontra totalmente elucidada. Relatos da literatura mostram que derivados acilados de rutina tiveram menor atividade de neutralização de radicais livres em comparação à rutina padrão, fato que foi atribuído à menor acessibilidade dos grupos OH aos radicais, causada pelo impedimento estérico criado por cadeias longas de AGs (LUE et al., 2010a). Resultados similares foram encontrados para a acilação enzimática da isoorientina e da isovitexina (MA et al., 2012). Entretanto, um estudo da biossíntese de derivados acilados de floridzina e de quercetina-3-glicosídeo com AGs de cadeia longa relatou que a alta atividade antioxidante dos compostos foi mantida após a reação de acilação (ZIAULLAH et al., 2013). Assim, são necessárias mais investigações para esclarecer o grau de influência da adição de cadeias acila à molécula do flavonoide em sua atividade de neutralização de radicais e os mecanismos pelos quais essa influência possa ser exercida.

4.2. Atividade antiproliferativa

A Tabela 13 mostra os resultados da atividade antiproliferativa dos flavonoides padrão e de seus derivados acilados, avaliada pelo método MTT, em cultura de células tumorais

humanas. Este ensaio consiste na avaliação do dano ao metabolismo celular através da redução do sal em cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais.

Tabela 13. Atividade antiproliferativa dos flavonoides naringina, rutina e hesperidina e seus derivados acilados determinada pelo método MTT em cultura de células tumorais humanas, após 48 h de incubação, expressa em IC₅₀ (µg/mL).

Amostra	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT-29	HaCaT
Doxorrubicina								
Naringina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Hexanoato de naringina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Octanoato de naringina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Decanoato de naringina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Rutina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Hexanoato de rutina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Octanoato de rutina	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	-
Decanoato de rutina	>100	>100	>100	-	>100	-	-	-
Hesperidina	-	-	-	>100	>100	89,38	>100	>100
Hexanoato de hesperidina	-	-	-	>100	>100	>100	>100	>100
Octanoato de hesperidina	-	-	-	>100	>100	>100	>100	>100
Decanoato de hesperidina	-	-	-	>100	>100	>100	>100	>100

*Linhagens celulares tumorais humanas: U251- glioma, MCF-7 – mama, NCI-ADR/RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, NCI-H460 - pulmão tipo não pequenas células, PC-3 – próstata, Ht-29 – colon / Linhagem celular não tumoral: HaCaT - queratinócito humano. –
- linhagens em que o composto não foi avaliado

Com exceção da hesperidina padrão, que demonstrou capacidade de inibição do crescimento da linhagem tumoral PC-3 (IC₅₀ = 89,38), os demais flavonoides (padrão e acilados) testados não foram capazes de inibir as linhagens celulares nas concentrações testadas (Tabela 13). O presente estudo sugere que investigações neste âmbito sejam futuramente consideradas.

Por outro lado, a avaliação do crescimento celular da linhagem HaCat, feita com a hesperidina e com seus derivados acilados, mostrou que estes compostos não exercem atividade citotóxica sobre esta linhagem não tumoral. A presença de atividade antiproliferativa para a linhagem PC-3 com ausência de atividade citotóxica em células não tumorais indica a possibilidade da aplicação da hesperidina como auxiliar terapêutico para o combate ao adenocarcinoma de próstata.

Embora a reação de acilação tenha aumentado a lipofilicidade dos derivados acilados em comparação com os flavonoides padrão, conforme avaliado pelos coeficientes de partição (item 4.4, Capítulo I), e também melhorado a atividade antioxidante dos derivados acilados de hesperidina e rutina com os ácidos octanoico e decanoico, avaliada pelo método DPPH (item 4.1, Capítulo II), o processo não interferiu na atividade antiproliferativa dos compostos.

A atividade antioxidante dos flavonoides poderia interferir negativamente na apoptose de células tumorais, que é um mecanismo dependente de EROs. O estágio inicial da apoptose é caracterizado por uma alteração no potencial de membrana mitocondrial. A produção de EROs endógenas como subproduto da respiração mitocondrial é rigidamente controlada pelo potencial de membrana mitocondrial; portanto, a interrupção na homeostase de EROs desempenha papel crítico na regulação dos eventos apoptóticos (KIM et al., 2011). Alguns flavonoides exercem sua atividade antitumoral através da indução da apoptose, mediada por sua atividade pró-oxidante (LOA; CHOW; ZHANG, 2009; WANG et al., 2005), dado que foi reportado para as catequinas (LAMBERT e ELIAS, 2010).

Além da atividade antioxidante, outros mecanismos estão relacionados à atividade antitumoral de flavonoides e seus derivados, tais como a atividade antiangiogênica (DAI et al., 2013; XANTHAKIS et al., 2010) e a atividade antimetastática (WENG e YEN, 2012).

A atividade antiproliferativa dos flavonoides quando associados a quimioterápicos através de efeitos sinérgicos também é um mecanismo cuja relevância tem sido destacada em estudos recentes. Relatos demonstram que a administração conjunta do flavonoide fisetina com o quimioterápico sorafenib reduziu de forma mais efetiva a migração e a invasão de células de melanoma (BRAF), em culturas de células, quando comparada à administração de ambos os compostos individualmente (PAL et al., 2016). Efeitos sinérgicos da fisetina combinada com o sorafenib levaram à ativação de vias apoptóticas mediadas por caspases e dependentes da mitocôndria em células de tumor cervical (HeLa) (LIN et al., 2016). Em um estudo utilizando células de tumor de mama (TNBC), a fisetina também foi capaz de induzir a interrupção do ciclo celular, a apoptose dependente de caspases e de potencializar a citotoxicidade de drogas

quimioterápicas (cisplatina, 5-fluorouracil e ciclofosfamida) (SMITH et al., 20116). Em células de astrocitoma (MOGGCCM) e de glioblastoma (T98G), o uso da quercetina potencializou os efeitos pró-apoptóticos do sorafenib, demonstrando que ambos os compostos, quando combinados, são indutores altamente eficazes de morte celular programada (JAKUBOWICZ-GIL et al, 2014).

Visto que o presente trabalho representa uma investigação inicial sobre a atividade antitumoral de novos derivados acilados de flavonoides, futuros estudos envolvendo este possível mecanismo de ação sinérgica desses compostos com quimioterápicos, assim como análises sobre sua atividade antiangiogênica e antimetastática, são desejáveis para melhor elucidar o potencial antitumoral dessas moléculas.

4.3. Atividade antimicrobiana

A Tabela 14 mostra os resultados de MIC das amostras de flavonoides padrão e de seus derivados obtidos por acilação enzimática (hexanoato de rutina, de hesperidina e de naringina, octanoato de rutina, de hesperidina e de naringina e decanoato de naringina).

No presente estudo, nenhum dos flavonoides e dos derivados acilados demonstrou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas (até 2 mg/mL), embora relatos da literatura indiquem o potencial antimicrobiano da naringina e da naringenina (TSUCHIYA et al., 1996; RAUHA et al., 2000; RAMASWAMY et al., 1972) e da quercetina e seus glicosídeos, incluindo a rutina (RAUHA et al., 2000; RAMASWAMY et al., 1972).

Na literatura, resultados discrepantes são encontrados para a atividade antimicrobiana de flavonoides acilados. Resultados positivos de inibição do crescimento de *S. aureus* foram relatados para derivados acilados de crisoeriol dissacarídico biossintetizados por acilação enzimática com laurato de vinila ($IC_{50} = 1$ mg/mL), mas nenhuma atividade foi detectada para o flavonoide original. O aumento da atividade antimicrobiana foi atribuído ao aumento da lipofilicidade da molécula do flavonoide proporcionado pela reação de acilação (MELLOU et al., 2005). Entretanto, outro estudo relatou ausência de atividade antimicrobiana tanto para a quercetina (molécula de maior lipofilicidade em relação à rutina, pela ausência do resíduo glicosídico que aumenta o número de hidroxilas da molécula e, portanto, aumenta sua hidrofiliicidade) quanto para seus derivados acilados biossintetizados por acilação enzimática (acetil, butiril, iso-butiril, caproil, decanoil, lauroil, miristoil e palmitoil-ésteres), em concentração máxima de 100 µg/mL, para todas as linhagens

bacterianas estudadas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria ivanovi*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria serligeri*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella tiphymurium*) (GATTO et al., 2002).

TABELA 14. Resultados de MIC (Concentração Inibitória Mínima) (mg/mL) das amostras de flavonoides padrão e seus derivados obtidos por acilação enzimática para as linhagens microbianas estudadas.

Amostras	C.	P.	E.	S.	S.
	<i>albicans</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>coli</i>	<i>choleraesuis</i>	<i>aureus</i>
rutina padrão	*	*	*	*	*
hesperidina padrão	*	*	*	*	*
naringina padrão	*	*	*	*	*
quercetina padrão	*	*	*	*	*
glicosil-hesperidina	*	*	*	*	*
hexanoato de rutina	*	*	*	*	*
octanoato de rutina	*	*	*	*	*
hexanoato de hesperidina	*	*	*	*	*
octanoato de hesperidina	*	*	*	*	*
hexanoato de naringina	*	*	*	*	*
octanoato de naringina	*	*	*	*	*
decanoato de naringina	*	*	*	*	*
antibiótico	0,002	0,062	0,004	0,002	0,007

*= não foi observada inibição na faixa de concentração estudada

As divergências entre os resultados relatados na literatura podem ser atribuídas aos diferentes métodos usados. A precipitação de flavonoides ocorre quando estes são solubilizados em solventes orgânicos e diluídos em soluções neutras polares. Em ensaios de MIC, a precipitação pode diminuir o contato entre as células bacterianas e as moléculas do flavonoide, levando a resultados falso-negativos quanto à sua atividade antimicrobiana. Alguns flavonoides podem formar sais em contato com solventes alcalinos, o que pode alterar seu potencial antimicrobiano, levando a resultados falsos positivos ou falsos negativos. Outras variações podem ocorrer de acordo com a fonte do flavonoide (natural ou comercial) ou com a companhia ou fonte natural do qual o flavonoide foi obtido (CUSHNIE e LAMB, 2005). Estes fatores podem ter sido

significativos no presente estudo, explicando assim a ausência de atividade antibacteriana dos compostos em todas as linhagens utilizadas.

4.4. Modulação enzimática

4.4.1. Cinética de inibição da xantina oxidase (XO)

Foram avaliados os efeitos de três flavonoides (rutina, hesperidina e naringina) e seus derivados acilados com 6, 8 e 10 átomos de carbonos sobre a atividade enzimática da XO.

Foi usado o composto alopurinol como controle positivo, pois na literatura este é referido como um potente inibidor específico da XO (NGUYEN et al., 2006), sendo amplamente utilizado como composto inibitório de referência.

Os dados da Figura 18 mostram que os flavonoides antes e também após a acilação, quando comparados ao alopurinol, apresentam fraca atividade inibitória. Por outro lado, três derivados acilados, decanoato de hesperidina, octanoato de naringina e decanoato de naringina, mostraram maior potencial de inibição de XO quando comparado ao seu precursor. Já para os derivados da rutina, não houve aumento significativo da atividade de inibição da XO.

Os ensaios de cinética enzimática com a XO foram realizados com os derivados que mostraram potencial como inibidores da enzima. As reações foram realizadas utilizando duas concentrações diferentes (45 e 90 μM) do inibidor (decanoato de hesperidina, octanoato de naringina ou decanoato de naringina) e três concentrações crescentes de substrato (xantina: 250, 500 e 750 μM). As reações foram realizadas na presença e ausência de inibidor, tendo sido obtidas as curvas de Michaelis-Menten e a representação gráfica de Lineaweaver-Burk (duplo recíproco) apresentadas nas Figuras 19 a 21.

Como esperado, a velocidade das reações vai gradualmente aumentando à medida que a concentração de substrato (xantina) aumenta. Verifica-se que a resposta inibitória dos flavonoides acilados (octanoato de naringina, decanoato de naringina e de hesperidina) sobre a XO é proporcional a sua concentração, sendo que a concentração de 90 μM de inibidor promove uma maior redução na velocidade da reação (concentração de ácido úrico formado/min), o que pode ser melhor visualizado quando em baixas concentrações do substrato.

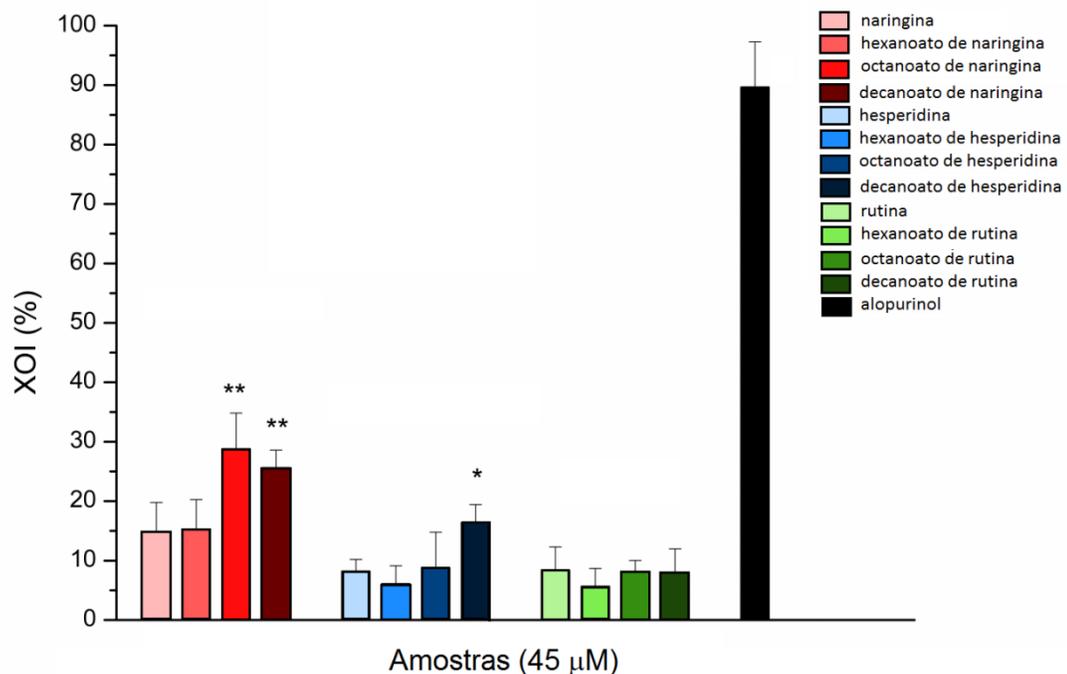


FIGURA 18. Efeito dos flavonoides e derivados acilados (45 μM) na atividade na inibição da enzima xantina oxidase (concentração de substrato de 250 μM). A = Naringina, B = Hexanoato de naringina, C = Octanoato de naringina, D = Decanoato de naringina, E = Hesperidina, F = Hexanoato de hesperidina, G = Octanoato de hesperidina, H = Decanoato de hesperidina, I = Rutina, J = Hexanoato de rutina, K = Octanoato de rutina, L = Decanoato de rutina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Os resultados obtidos também foram analisados pela representação gráfica do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, tendo sido determinados os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 15) por extrapolação gráfica. Também foi calculada a razão $V_{m\acute{a}x}/K_m$ para determinar a eficiência catalítica. O gráfico duplo recíproco, expresso como $1/V_o$ (y) versus $1/[S]$ (x) resulta em uma reta, onde a inclinação é o valor de $K_m/V_{m\acute{a}x}$, o intercepto no eixo $1/V_o$ é igual a $1/V_{m\acute{a}x}$ e o intercepto no eixo $1/[S]$ é igual a $-1/K_m$.

A análise do perfil de inibição obtido através da representação gráfica de Lineweaver-Burk permite avaliar o tipo de inibição do composto em estudo e que pode indicar uma das seguintes possibilidades: inibição reversível (competitiva ou não competitiva) ou inibição irreversível. Na inibição reversível o tipo de inibição classifica-se segundo o efeito que produzam nas constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Este efeito dependerá da união do inibidor à enzima E, ao complexo enzima-substrato ES ou a ambos. Os inibidores competitivos são aqueles que se assemelham ao substrato e, portanto, ocupam o sítio ativo. A ligação do inibidor não permite que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima. Quando $[S]$ exceder em muito $[I]$, a

probabilidade de uma molécula inibidora se ligar à enzima é minimizada e a reação exibirá um $V_{máx}$ normal. Porém, o valor de K_m (também chamado de K_m aparente e expresso como a $[S]$ em que $V_o = \frac{1}{2}V_{máx}$) estará aumentado na presença do inibidor. Este efeito no aumento do K_m aparente, combinado com a ausência de efeito no $V_{máx}$, é diagnóstico de inibição competitiva e é facilmente revelada por um gráfico dos duplos-recíprocos.

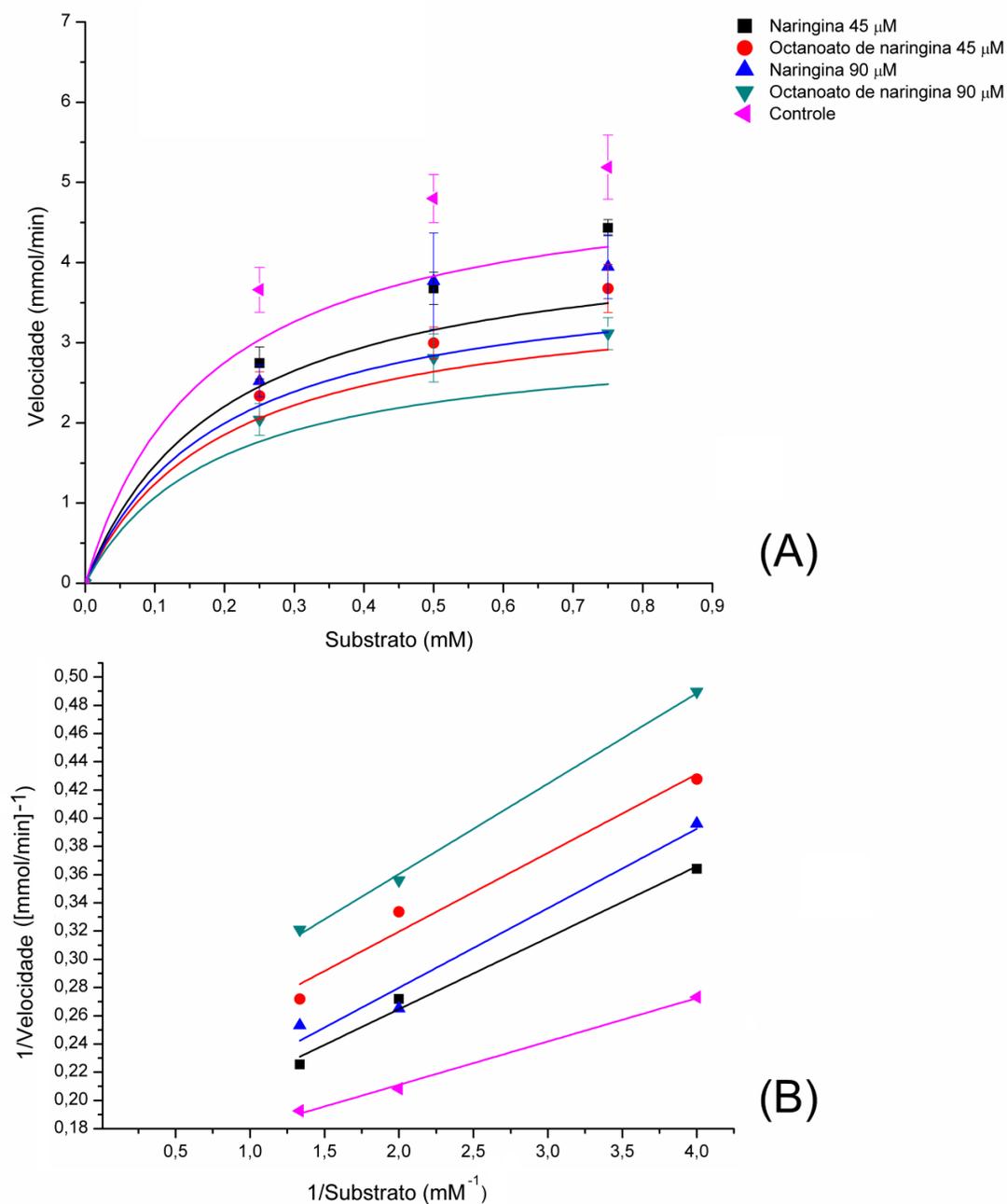


FIGURA 19. Perfil cinético de inibição da xantina oxidase pelo octanoato de naringina (45 e 90 μM).

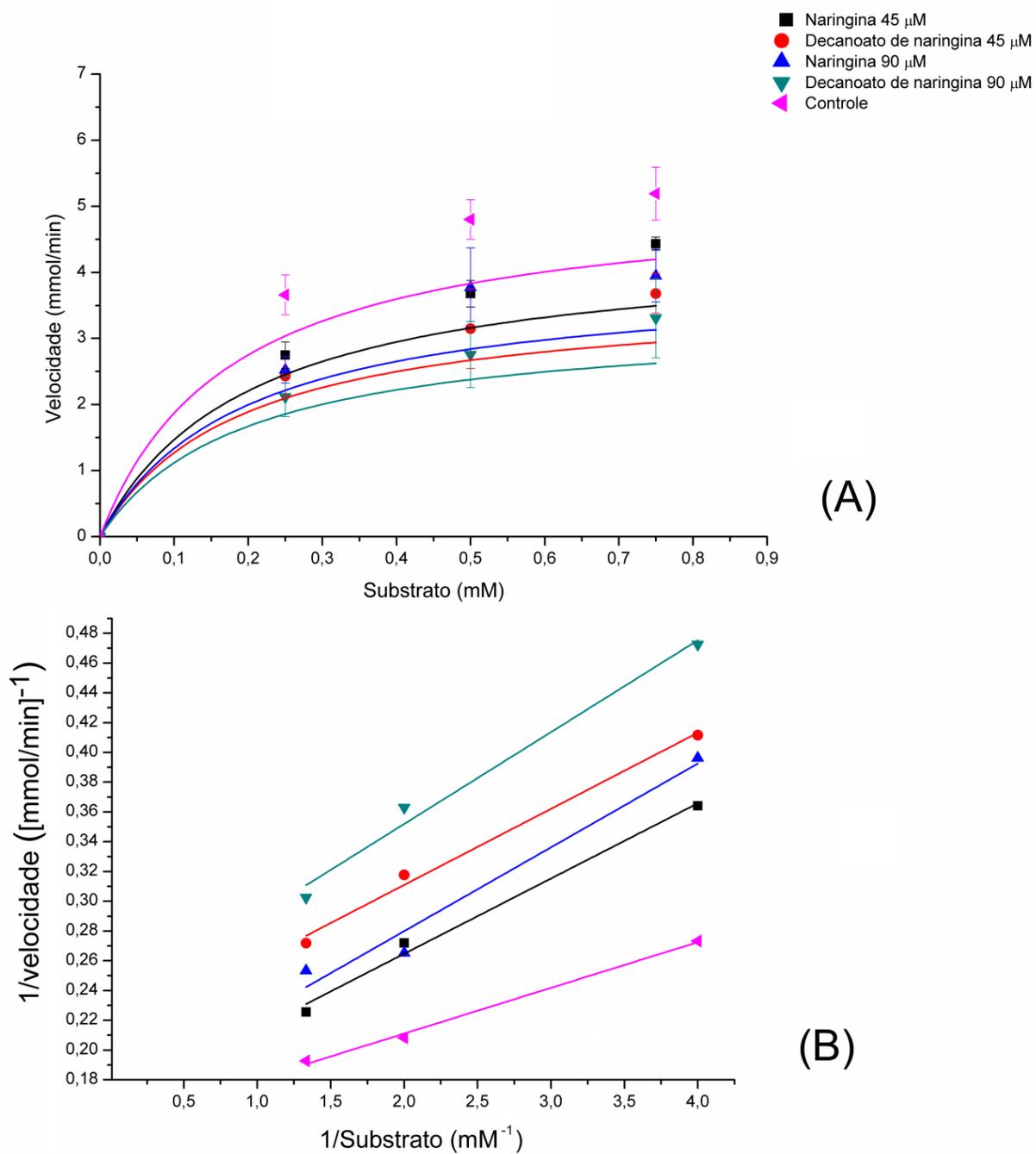


FIGURA 20. Perfil cinético de inibição da xantina oxidase pelo decanoato de naringina (45 e 90 μM).

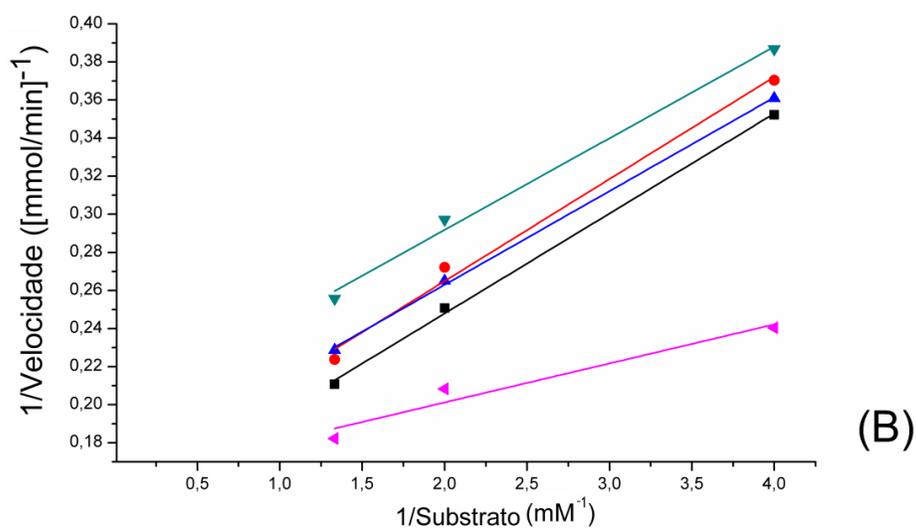
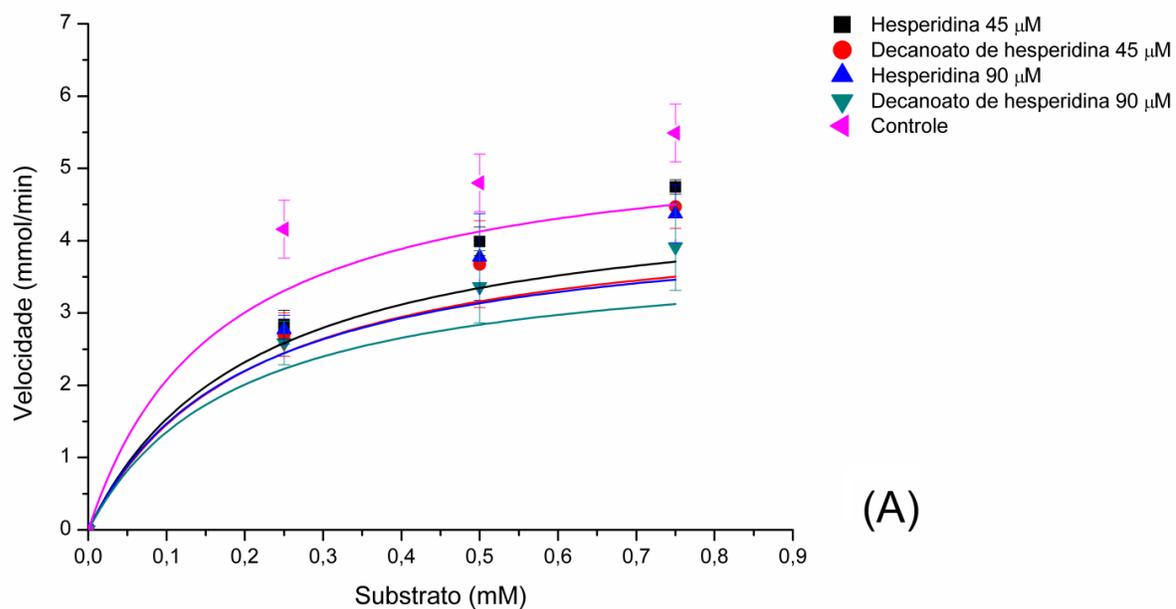


FIGURA 21. Perfil cinético de inibição da xantina oxidase pelo decanoato de hesperidina (45 e 90 μM).

A Tabela 15 mostra os parâmetros cinéticos da reação catalisada pela XO na ausência e na presença dos flavonoides hesperidina e naringina e de seus derivados acilados.

TABELA 15. Parâmetros cinéticos da reação enzimática catalisada pela xantina oxidase na ausência (controle) e em presença de diferentes inibidores (45 e 90 μ M).

Inibidor	Concentração do inibidor (μ M)	$V_{\text{máx}}$ (mmol/min)	K_m (mM)	$V_{\text{máx}}/K_m$
Controle	0	5,19 \pm 0,15	0,17	30,52
Naringina	45	4,43 \pm 0,07	0,20**	22,15
	90	3,68 \pm 0,03	0,18	20,44
Octanoato de naringina	45	3,94 \pm 0,91	0,19*	20,74
	90	3,11 \pm 0,18	0,17	18,29
Decanoato de naringina	45	3,94 \pm 0,63	0,19*	20,74
	90	3,30 \pm 0,70	0,20**	16,50
Controle	0	5,49 \pm 0,53	0,16	34,31
Hesperidina	45	4,74 \pm 0,67	0,20**	23,70
	90	4,37 \pm 0,27	0,19**	23,00
Decanoato de hesperidina	45	4,47 \pm 0,45	0,20**	22,35
	90	3,91 \pm 0,78	0,22**	17,77

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

Segundo os dados da Tabela 15, considerando que os valores de $V_{\text{máx}}$ não mostraram alterações significativas e os valores de K_m foram maiores na presença dos inibidores, pressupõe-se uma reação de inibição reversível competitiva. Um inibidor competitivo age apenas para aumentar o valor de K_m do substrato. À medida que a concentração de inibidor aumenta, é esperado que o valor de K_m também aumente; entretanto, esse aumento foi observado somente para os derivados acilados com ácido decanoico (decanoato de hesperidina e de naringina). Este fato está de acordo com um estudo que avaliou a inibição da atividade da XO por diversos flavonoides, relatando que todos se comportaram como inibidores

competitivos. A partir de análises cinéticas, o relato sugeriu que os flavonoides ligam-se ao sítio ativo da enzima (LIN et al., 2002).

A Tabela 16 mostra os valores de IC_{50} calculados para os flavonoides e seus derivados acilados.

TABELA 16. Valores de IC_{50} (μM) dos flavonoides precursores e de seus derivados acilados.

Inibidor	Equação da reta	Valor R^2	IC_{50} (μM)
Naringina	$y = 2,55 + 0,23x$	0,90	206,30
Octanoato de naringina	$y = 5,86 + 0,40x$	0,84	110,35
Decanoato de naringina	$y = 4,17 + 0,39x$	0,89	117,51
Hesperidina	$y = 0,15x$	0,99	333,33
Decanoato de hesperidina	$y = 2,25 + 0,24x$	0,91	198,96

A Figura 22 ilustra os valores da XOI (%) *versus* concentração dos flavonoides e derivados acilados (μM) e as equações da reta determinadas para as amostras analisadas.

Flavanonas (hesperidina e naringina), isoflavonas (genisteína), catequinas e antocianidinas são considerados fracos inibidores da atividade da XO. Entretanto, as flavonas (luteína e apigenina) e os flavonóis (como quercetina, kaempferol, e miricetina) são capazes de inibir a atividade desta enzima mesmo em baixas concentrações (IIO et al., 1985; COS et al., 1998; NAGAO; SEKI; KOBAYASHI, 1999; VAN HOORN et al., 2002).

A planaridade da molécula é requisito importante para a atividade inibitória. Além disto, a introdução de grupos hidroxilas nas posições C5 e C7 aumenta a ação inibitória (como ocorre no caso da luteína), enquanto que a presença destes grupos em C2 e C3 leva a diminuição deste efeito (VAN HOORN et al., 2002). A presença do grupo hidroxila no C3 da quercetina ($IC_{50} = 1,5 \mu M$) reduz seu efeito inibitório comparado ao da luteína ($IC_{50} = 0,75 \mu M$). A estrutura da apigenina (5,7,4'-OH) é considerada a mais favorável para a ligação ao sítio ativo da enzima (LIN et al., 2002).

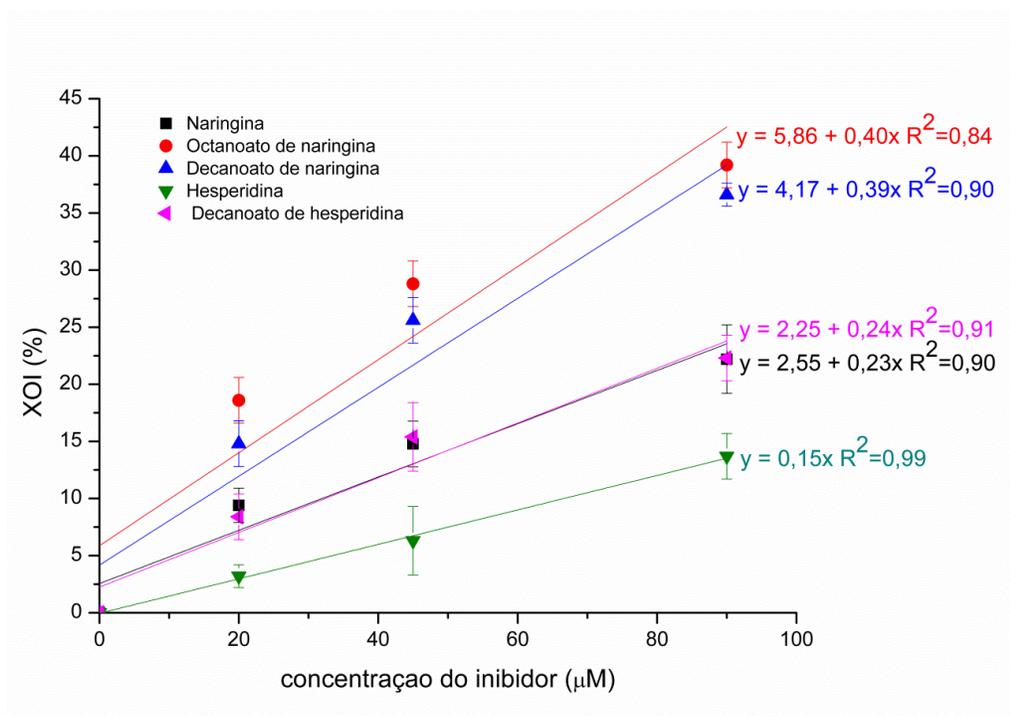


FIGURA 22. Representação gráfica dos valores da XOI (%) *versus* concentração dos flavonoides precursores e acilados (μM).

A presença de unidades de açúcares na estrutura dos flavonoides também leva à diminuição do poder inibitório, assim, a aglicona (como quercetina) é um inibidor mais eficiente que sua forma glicosilada (rutina) (LIN et al., 2002). Estudos anteriores feitos pelo nosso grupo demonstraram que a quercetina, forma aglicona da rutina, inibiu a atividade da XO em cerca de 80%, enquanto a rutina teve atividade inibitória em torno de 16% (ARAÚJO et al., 2013).

A menor atividade de inibição da XO pela rutina pode ser atribuída à substituição do grupo 3-OH pelo resíduo O-ramnoglicosídico. Assim, a menor atividade inibitória se deve principalmente ao fato de substituintes (glicídicos, alcóxila, metóxi e outros) bloquearem os grupos OH responsáveis pela ação da molécula sobre a XO (SELLOUM et al., 2001). De forma similar, a ramnetina, um derivado da quercetina com uma substituição metóxi na posição 7-OH, demonstrou uma atividade de inibição da XO cem vezes inferior à da quercetina (NAGAO; SEKI; KOBAYASHI, 1999).

O aumento da lipofilicidade da molécula do flavonoide pode melhorar a acessibilidade ao sítio ativo da enzima (RAO et al., 2003). A atividade de inibição da XO pelos flavonoides pode ser explicada pelas suas propriedades de superfície, em especial ao seu caráter anfifílico (IIO et al., 1985). A CALB demonstra alta atividade de síntese quando utilizados doadores acilas de

cadeia curta e média, e menor atividade em doadores acila de cadeia longa (SALEM et al., 2010). Derivados acilados da isoquercitrina demonstraram maior atividade de inibição da XO quando comparados à isoquercitrina, e esse aumento foi atribuído ao aumento da lipofilicidade das moléculas (SALEM et al., 2010).

4.4.2. Inibição da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A Tabela 17 apresenta os resultados de atividade da MPO (em unidade de MPO) encontrados para os flavonoides padrão (rutina, naringina e hesperidina) e seus derivados acilados com ácido decanoico.

TABELA 17. Atividade da mieloperoxidase (unidades de MPO, UMPO) do meio RPMI (controle) e das amostras de flavonoides padrão e acilados com ácido decanoico nas concentrações de 2,5 e 5,0 µg/mL.

Amostra	Concentração (µg/mL)	UMPO ^a (média ± DP) ^b
Meio RPMI	-	0,850 ± 0,049
Rutina	2,5	1,489 ± 0,069
	5,0	1,227 ± 0,195
Decanoato de rutina	2,5	1,360 ± 0,277
	5,0	1,133 ± 0,049
Naringina	2,5	1,664 ± 0,402
	5,0	1,221 ± 0,036
Decanoato de naringina	2,5	1,531 ± 0,149
	5,0	1,560 ± 0,164
Hesperidina	2,5	1,180 ± 0,078
	5,0	1,694 ± 0,192
Decanoato de hesperidina	2,5	1,555 ± 0,075
	5,0	1,617 ± 0,307

^a 1 UMPO corresponde à quantidade de enzima que degrada 1 µmol de H₂O₂ em H₂O e O⁻ por minuto a 25°C, o que gera uma variação de 0,0113 unidades de absorvância.

^b dados expressos como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Os flavonoides padrão não apresentaram atividade inibitória da MPO, contrariamente aos relatos da literatura que indicam alta atividade de inibição desta enzima pela rutina, com valores de IC₅₀ de 3,60 µM (REGASINI et al., 2008). No presente estudo, os ensaios enzimáticos foram realizados em neutrófilos de sangue periférico de voluntários saudáveis, conforme descrito no item 3.4.2. Visto que a MPO é um marcador de inflamação, disfunção endotelial e doenças

cardiovasculares (SAVU et al., 2014), em neutrófilos de pessoas saudáveis essa enzima se encontra em níveis baixos, o que possivelmente influenciou os resultados do estudo.

A reação de acilação dos flavonoides não demonstrou eficácia na melhora de sua atividade de inibição da MPO (Tabela 17). Estudos indicam que o log *P* do flavonoide é um fator determinante para sua atividade de inibição da MPO (SHIBA et al., 2008), assim, era esperado que o aumento na lipofilicidade dos flavonoides através da reação de acilação pudesse levar a um aumento de sua atividade de inibição da MPO, o que não foi observado no presente estudo. Portanto, maiores investigações sobre a relação estrutura-atividade dos flavonoides envolvendo a capacidade de inibição da MPO se fazem necessários para elucidar a influência do processo de acilação na modulação da atividade desta enzima.

4.4.3. Inibição da atividade da lipase pancreática porcina

As Figuras 23 a 25 apresentam os resultados dos ensaios de inibição da lipase pancreática porcina pelos flavonoides (hesperidina, rutina e naringina) e pelos derivados acilados obtidos por acilação dos flavonoides com os ácidos hexanoico, octanoico e decanoico. Como controle foi utilizado um ensaio da lipase pancreática sem inibidor.

No presente estudo, dos três flavonoides padrão investigados (hesperidina, rutina e naringina), somente a hesperidina se comportou como um potente inibidor da lipase pancreática, com atividade comparável à do orlistat, na menor concentração testada (75 µg/mL) (Figura 23). A alta atividade de inibição da lipase pancreática pela hesperidina está em conformidade com relatos da literatura, que mostram um valor de IC₅₀ de 32,0 µg/mL para esse flavonoide (KAWAGUCHI et al., 1997). A presença de um grupo metóxi na posição 4' da molécula da hesperidina parece favorecer a inibição da lipase pancreática (KAWAGUCHI et al., 1997).

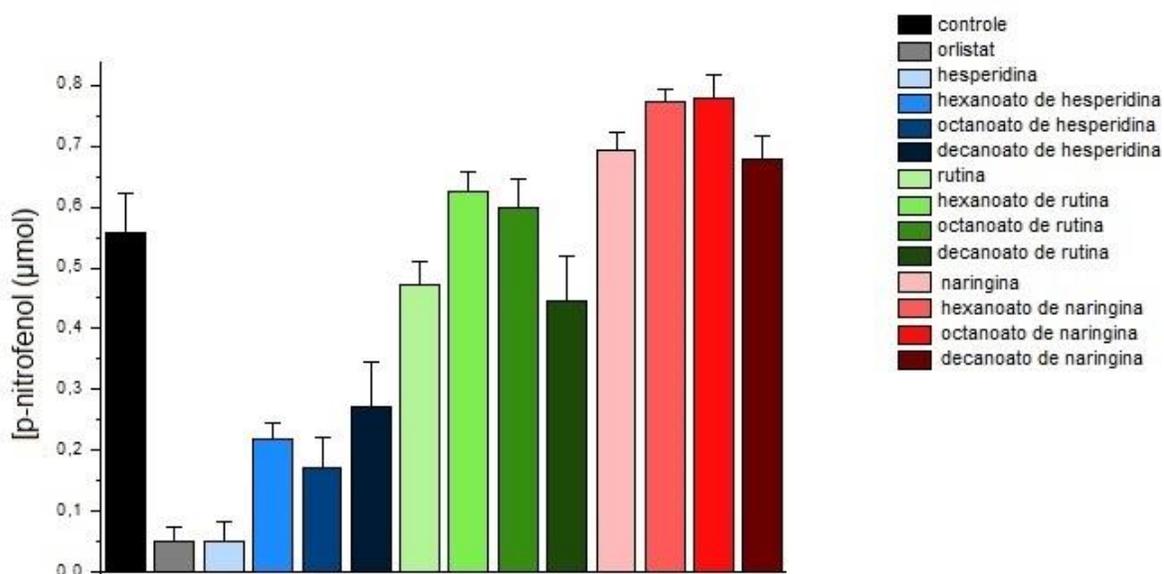


FIGURA 23. Atividade da lipase pancreática porcina, representada pela concentração de p-nitrofenol (µmol) produzida para as amostras de orlistat (inibidor padrão), flavonoides e flavonoides acilados na concentração de 75 µg/mL. Dados representados como média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

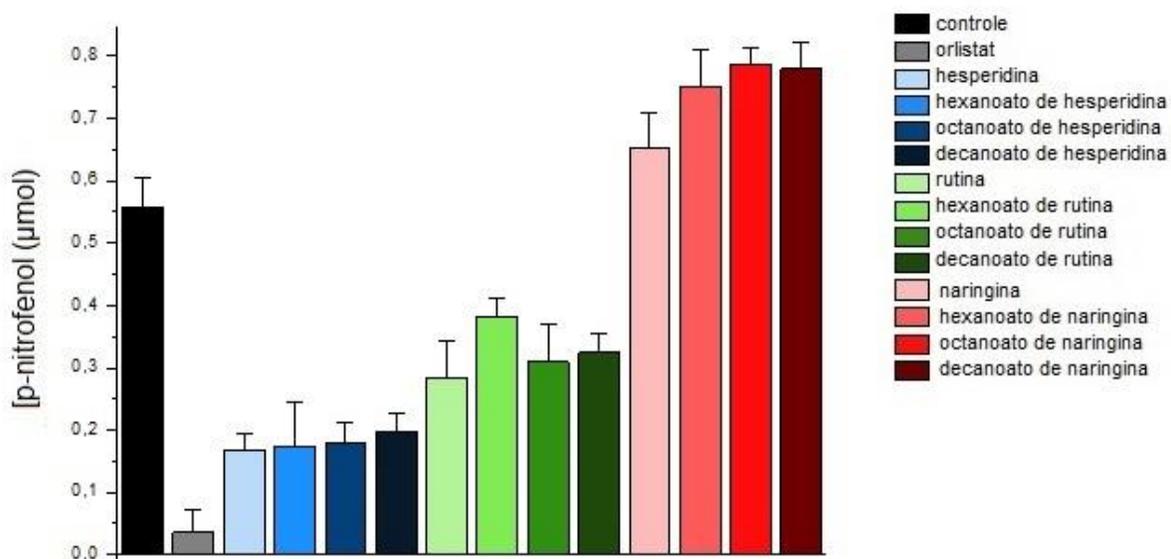


FIGURA 24. Atividade da lipase pancreática porcina, representada pela concentração de p-nitrofenol (µmol) produzida para as amostras de orlistat (inibidor padrão), flavonoides e flavonoides acilados na concentração de 150 µg/mL. Dados representados como média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

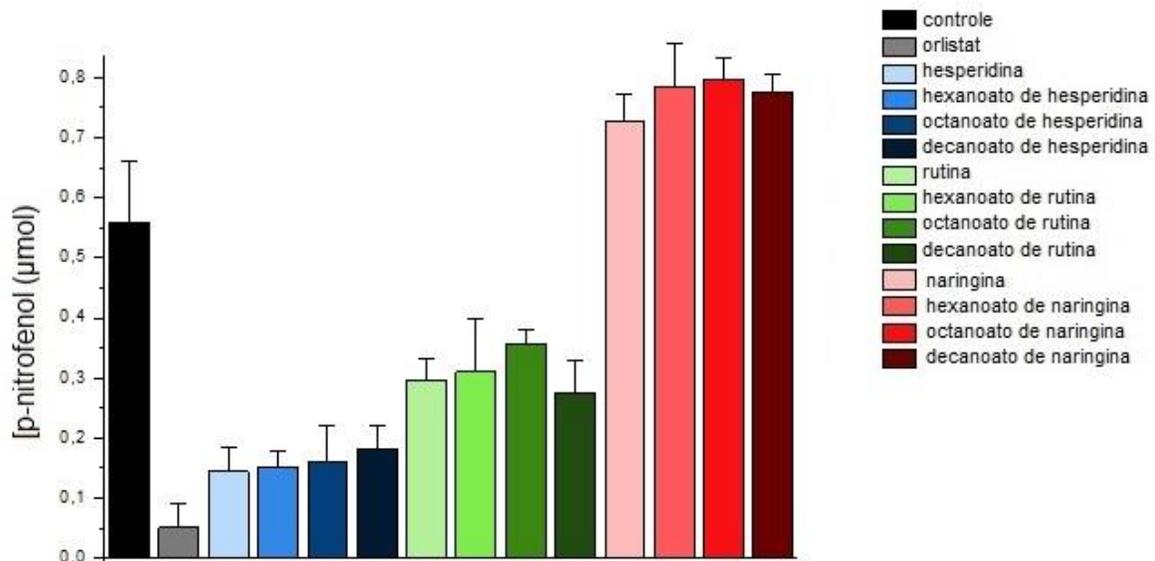


FIGURA 25. Atividade da lipase pancreática porcina, representada pela concentração de p-nitrofenol (μmol) produzida para as amostras de orlistat (inibidor padrão), flavonoides e flavonoides acilados na concentração de $300 \mu\text{g/mL}$. Dados representados como média e desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

O aumento na concentração de hesperidina para 150 e $300 \mu\text{g/mL}$ não foi capaz de aumentar significativamente sua capacidade de inibição, não sendo possível estabelecer uma relação de dose-dependência (Figuras 24 e 25). O processo de acilação da hesperidina diminuiu sua capacidade de inibição da lipase pancreática.

O estudo mostrou que a rutina possui baixa capacidade de inibição da lipase pancreática, dado que está de acordo com relatos da literatura, que apresentam valores de $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ para esse flavonoide (LUNAGARIYA et al., 2014). Houve um aumento na atividade inibitória da rutina e de seus derivados com o aumento da concentração das amostras de 75 para $150 \mu\text{g}$ (Figuras 23 e 24), mas o mesmo não foi observado quando a concentração das amostras aumentou para $300 \mu\text{g/mL}$ (Figura 25). De forma semelhante ao observado para a hesperidina, não foi possível estabelecer uma relação de dose-dependência para a inibição da lipase pancreática pela rutina. O derivado decanoato de rutina mostrou atividade inibitória similar à da rutina padrão, enquanto o hexanoato de rutina e o octanoato de rutina tiveram sua atividade de inibição reduzida em relação à rutina padrão.

Já a naringina e seus derivados acilados não foram capazes de inibir a lipase pancreática porcina em nenhuma das concentrações testadas. Relatos da literatura confirmam que a naringina não possui capacidade de inibição dessa enzima, fato que pode ser atribuído à

ausência de um grupo OH na posição 3' e à substituição do grupo metóxi da posição 4' por um grupo OH (KAWAGUCHI et al., 1997).

Estudos sobre o mecanismo de inibição da lipase por flavonoides são relativamente escassos e apresentam amplas inconsistências entre si, tanto em relação aos métodos de ensaio quanto aos resultados em si (RAHIM; TAKAHASI; YAMAKI, 2015; GROVE et al., 2012; MCDUGALL; KULKARNI; STEWART, 2009; NAKAI et al., 2005; MORENO et al., 2003). Assim, investigações mais amplas sobre o papel da estrutura da molécula do flavonoide na modulação da lipase, como aqueles envolvendo técnicas de modelagem molecular, se tornam necessárias para elucidar a influência do processo de acilação dos flavonoides em sua capacidade de inibir a atividade desta enzima.

5. CONCLUSÃO

Os resultados comprovaram a eficiência da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) na acilação de flavonoides glicosilados (hesperidina, naringina e rutina), levando à obtenção de derivados acilados com elevada regioseletividade e com bons rendimentos. É possível atestar a regioseletividade da enzima na acilação de uma das hidroxilas da fração glicosídica dos flavonoides, visto que a acilação não foi observada para a aglicona (quercetina). Os valores dos coeficientes de partição encontrados para os derivados acilados biossintetizados com ácido decanoico, superiores aos dos flavonoides de origem, demonstraram que a reação de acilação aumenta a lipofilicidade desses compostos, o que pode levar à melhoria da biodisponibilidade dos mesmos e facilitar sua aplicação tecnológica em meios lipofílicos. A avaliação das propriedades biológicas sugere que os novos derivados de hesperidina e rutina aciladas com os ácidos octanoico e decanoico são moléculas promissoras em relação ao potencial antioxidante, avaliado pelo método DPPH, e os derivados decanoato de hesperidina, octanoato de naringina e decanoato de naringina são inibidores competitivos reversíveis da xantina oxidase, indicando possível aplicação terapêutica. Não foi observada atividade antiproliferativa, avaliada pelo método MTT, para os flavonoides padrão e seus derivados. A acilação não foi eficaz para aumentar a atividade de inibição da lipase pancreática porcina dos compostos.

Os resultados alcançados no presente estudo, que apontam os derivados acilados de flavonoides como compostos de interesse em relação à neutralização de espécies reativas de oxigênio e ao combate à formação dessas moléculas, somados à escassez de relatos da literatura acerca das atividades biológicas desses compostos, indicam a necessidade de continuação das pesquisas na área. Os processos de biotransformação propostos constituem

relatos inéditos para a geração de novos compostos funcionais, além de apresentar uma base para a ampliação do conhecimento sobre a relação estrutura/atividade biológica dos derivados acilados de flavonoides.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

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

AL-DHABI, N. A.; ARASU, M. V.; PARK, C. H.; PARK, S. U. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, v. 14, p. 59-63, 2015.

ALMEIDA, V. M.; BRANCO, C. R. C.; ASSIS, S. A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A. Synthesis of naringin 6''-ricinoleate using immobilized lipase. *Chemistry Central Journal*, v. 6, p. 41-47, 2012.

ARAÚJO, M. E. M. B.; CONTESINI, F. J.; FRANCO, Y. E. M.; SAWAYA, A. C. F.; ALBERTO, T. G.; DALFRÉ, N.; CARVALHO, P. O. Optimized enzymatic synthesis of hesperidin fatty acid esters in a two-phase system containing ionic liquid. *Molecules*, v. 16, p. 7171-7182, 2011.

ARAÚJO, M. E. M. B.; FRANCO, Y. E. M.; ALBERTO, T. G.; SOBREIRO, M. A.; CONRADO, M. A.; PRIOLLI, D. G.; SAWAYA, A. C. H. F.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; CARVALHO, P. O. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chemistry*, v. 141, p. 266-273, 2013.

ARDHAOU, M.; FALCIMAIGNE, A.; OGNIER, S.; ENGASSER, J. M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *Journal of Biotechnology*, v.110, n. 3, p. 265-71, 2004a.

ARDHAOU, M.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J-M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOUL, M. Acylation of flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 29, p. 63-67, 2004b.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 3–12, 1999.

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

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

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

- BOSE, M.; LAMBERT, J. D.; JIHYEUNG, J.; KENNETH, R. R.; SHAPSES, S. A.; CHUNG, S. Y. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *Journal of Nutrition*, v. 138, p. 1677-1683, 2008.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BROWN, J. E.; KHODR, H.; HIDER, R. C.; RICE-EVANS, C. A. Structural dependence of flavonoid interaction with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, v. 330, n. 3, p. 1173-1178, 1998.
- BRUSSELMANS, K.; VROLIX, R.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 7, p. 5636-5645, 2005.
- BUCHHOLZ, T.; MELZIG, M. F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*, v. 81, p. 771-783, 2015.
- CAILET, S.; YU, H.; LESSARD, S.; LAMOUREUX, G.; AJDUKOVIC, D.; LACROIX, M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*, v. 100, p. 542-552, 2007.
- CÉLIZ, G.; DAZ, M. Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside pruning in organic media. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 94-100, 2011.
- CÉLIZ, G.; MARTEARENA, M. R.; SCARONI, E.; DAZ, M. Kinetic study of the alkyl flavonoid ester prunin-6''-O-laurate synthesis in acetone catalysed by immobilised *Candida antarctica* lipase B. *Biochemical Engineering Journal*, v. 69, p. 69-74, 2012.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. J. R. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews*, v. 5, p. 65-71, 2005.
- CHATURVEDI, A.; SINGH, S.; NAG, T. N. Antimicrobial activity of flavonoids from *in vitro* tissue culture and seeds of *Gossypium* species. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n. 1, p. 4959-4963, 2010.
- CHEBIL, L.; HUMEAU, C.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J-M; GHOUL, M. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2237-2251, 2006.
- CHEN, I. H.; KUO, M. C.; HWANG, S. J.; CHANG, J. M.; CHEN, H. C. Allopurinol-induced severe hypersensitivity with acute renal failure. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, v. 21, n. 5, p. 228-232, 2005.
- COLLINS, A. M.; KENNEDY, M. J. Biotransformations and bioconversions in New Zealand: past endeavours and future potential. *Australasian Biotechnology*, v. 9, p. 86-94, 1999.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 71-76, 1998.
- COTELLE, N.; BERNIER, J-L.; CATEAU, J-P; POMMERY, J.; WALLET, J-C; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, p. 35-43, 1996.
- COULON, D.; ISMAIL, A.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; GHOUL, M. Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *Journal of Biotechnology*, v. 51, p. 115-121, 1996.

- COX, S.; ABU-GHANNAM, N.; GUPTA, S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, v. 17, p. 205-220, 2010.
- CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 854, p. 435 – 442, 2006.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 343–356, 2005.
- DAI, Z-J.; LU, W-F.; GAO, J.; KANG, H-F., MA, Y-G., ZHANG, S-Q.; DIAO, Y., LIN, S.; WANG, X-J.; WU, W-Y. Anti-angiogenic effect of the total flavonoids in *Scutellaria barbata* D. Don. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, p. 150, 2013.
- DANIHELOVA, M.; VISKUPICOVA, J.; STURDIK, E. Lipophilization of flavonoids for their food, therapeutic and cosmetic applications. *Acta Chimica Slovaca*, v. 5, n. 1, p. 59-69, 2012.
- DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, v. 61, p. 1–31, 1995.
- DAVIES, K. M.; SCHWINN, K. E. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: ANDERSEN O. M.; MARKHAM, K. R. (Eds.) *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. 1^a ed. New York: CRC Press, 2006. p. 143–218.
- DEGN, P.; PEDERSEN, L. H.; DUUS, J.; ZIMMERMAN, W. Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in tert-butanol. *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 275-280, 1999.
- DE OLIVEIRA, E. B.; HUMEAU, C.; CHEBIL, L.; MAIA, E. R.; DEHEZ, F.; MAIGRET, B.; GHOUL, M.; ENGASSER, J-M. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 96-105, 2009.
- ENAUD, E.; HUMEAU, C.; PIFFAUT, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 27, p. 1-6, 2004.
- FERRER, J-L.; AUSTIN, M. B.; STEWART, C.; NOEL, J. P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 356–370, 2008.
- F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 19, n. 1, p. 56-72, 2003.
- GALLUZZO, P.; MARTINI, C.; BULZOMI, P.; LEONE, S.; BOLLI, A.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor α -dependent mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 53, n. 6, p. 699–708, 2009.
- GATTO, M. T.; FALCOCCHIO, S.; GRIPPA, E.; MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; NICOLOSI, G.; LAMBUSTA, D.; SASO, L. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 2, p. 269-72, 2002.
- GAYOT, S.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *Journal of Biotechnology*, v. 101, n. 1, p. 29-36, 2003.
- GONDOIN, A.; GRUSSU, D.; STEWART, D.; MCDOUGALL, G. J. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Research International*, v. 43, p. 1537-1544, 2010.

- GORINSTEIN, S.; HUANG, D.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; YAMAMOTO, K.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN BELLOSO, O.; MARTINEZ AYALA, A. L.; TRAKHTENBERG, S. Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, n. 17, p. 108-124, 2006.
- GROVE, K. A., SAE-TAN, S., KENNETT, M. J., & LAMBERT, J. D. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits pancreatic lipase and reduces body weight gain in high fat-fed obese mice. *Obesity*, v. 20, n. 11, p. 2311-2313, 2012.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 11, p. 210–218, 2010.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1–85, 1990.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v.142, p. 231-255, 2004.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, v. 92, p. 3007-3017, 1998.
- HARMALKAR, A.; SHAIKH, M.; KAMAT, S.; KAMAT, D. Enzyme assisted transformation of glycosides. *South Asian Journal of Biological Sciences*, v. 3, n. 2, p. 40-45, 2013.
- HE, J.; KLAG, M. J.; WHELTON, P. K.; MO, J. P.; CHEN, J. Y.; QUIAN, M. C. Oats and buckwheat intakes and cardiovascular disease risk factor in an ethnic minority of China. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, p. 366–372, 1995.
- HEANEY, R. P. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *Journal of Nutrition*, v. 131, n. 4, p. 1344-1348, 2001.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572-584, 2002.
- HIDALGO, A.; BORNSCHEUER, U. T. *Direct evolution of lipases and esterases for organic synthesis*. 1ª ed. New York: CRC Press, 2006.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 937-942, 1999.
- IIO, M.; MORIYAMA, A.; MATSUMOTO, Y.; TAKAKI, N.; FUKUMOTO, M. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 49, p. 2173–2176, 1985.
- INCA. *O que é o câncer?* Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em: 11 de maio de 2016.
- JAKUBOWICZ-GIL, J.; LANGNER, E.; BADZIUL, D.; WERTEL, I.; RZESKI, W. Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas. *Neurotoxicity Research*, v. 26, p. 64-77, 2014.
- JIANG, P.; BURCZYNSKI, F.; CAMPBELL, C.; PIERCE, G.; AUSTRIA, J. A.; BRIGGS, C. J. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, v. 40, p. 356–364, 2007.

- KATSOURA, M. H.; POLYDERA, A. C.; KATAPODIS, P.; KOLISIS, F. N.; STAMATIS, H. Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1326-1334, 2007.
- KATSOURA, M. H.; POLYDERA, A. C.; TSIRONIS, L.; TSELEPIS, A. D.; STAMATIS, H. Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 491–503, 2006.
- KAUR, P.; BAINS, N. S. Antimicrobial activity of flavonoids from *in vitro* tissue culture and plant parts of important halophytes of Western Rajasthan. *Current Biotica*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2012.
- KIM, K-Y.; YU, S-N.; LEE, S-Y.; CHUN, S-S.; CHOI, Y-L.; PARK, Y-M.; SONG, C. S.; CHATTERJEE, B.; AHN, S-C. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 413, p. 80–86, 2011.
- KIRCHNER, T.; HERMANN, E.; MÖLLER, S.; KLINGER, M.; SOLBACH, W.; LASKAY, T.; BEHNEN, M. Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators of Inflammation*, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- KONTOGIANNI, A.; SKOURIDOU, V.; SERETI, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 103, p. 655-660, 2001.
- KONTOGIANNI, A.; SKOURIDOU, V.; SERTETI, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N. Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 21, p. 59-62, 2003.
- KYRIAKOU, E.; PRIMIKYRI, A.; CHARISIADIS, P.; KATSOURA, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; STAMATIS, H.; TZAKOS, A. G. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 10, p. 1739-1742, 2012.
- LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 45–53, 2000.
- LAI, C-S.; LI, S.; LIU, C. B.; MIYAUCHI, Y.; SUZAWA, M.; HO, C-T.; PAN, M-H. Effective suppression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice with citrus peel flavonoids. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 57, p. 551-555, 2013.
- LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 501, n. 1, p. 65-72, 2010.
- LEE, E. M.; LEE, S. S.; CHUNG, B. Y.; CHO, J-Y.; LEE, I. C.; AHN, S. R.; JANG, S. J.; KIM, T. H. Pancreatic lipase inhibition by *c*-glycosidic flavones isolated from *Eremochloa ofiuroides*. *Molecules*, v. 15, p. 8251-8259, 2010.
- LEUNG, H. W-C.; KUO, C-L.; YANG, W-H.; LIN, C-H.; LEE, H-Z. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, v. 534, p. 12-18, 2006.
- LIN, C-M.; CHEN, C-S.; CHEN, C-T.; LIANG, Y-C.; LIN, J-K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 294, p. 167-172, 2002.

- LIN, M-T.; LIN, C-L.; LIN, T-Y.; CHENG, C-W.; YANG, S-F.; LIN, C-L.; WU, C-C.; HSIEH, Y-H.; TSAI, J-P. Synergistic effect of fisetin combined with sorafenib in human cervical cancer HeLa cells through activation of death receptor-5 mediated caspase-8/caspase-3 and the mitochondria-dependent apoptotic pathway. *Tumor Biology*, v. 37, p. 6987-6996, 2016.
- LOA, J.; CHOW, P.; ZHANG, K. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 63, p. 1007–1016, 2009.
- LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 214, p. 113-119, 2004.
- LUE, B-M.; NIELSEN, N. S.; JACOBSEN, C.; HELLGREN, L.; GUO, Z.; XU, X. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. *Food Chemistry*, v. 123, p. 221-230, 2010a.
- LUE, B-M.; GUO, Z.; GLASIUS, M.; XU, X. Scalable preparation of high purity rutin fatty acids esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, p. 551-561, 2010b.
- LUNAGARIYA, N. A.; PATEL, N. K.; JAGTAP, S. C.; BHUTANI, K. K. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, v. 13, p. 897-921, 2014.
- LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, p. 2743–2748, 2004.
- MA, X.; YAN, R.; YU, S.; LU, Y.; LI, Z.; LU, H. Enzymatic acylation of isoorientin and isovitexin from bamboo-leaf extracts with fatty acids and antiradical activity of the acylated derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 10844-10849, 2012.
- MADESWARAN, A.; UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; SIVASHANMUGAM, T.; SUBHADRADEVI, V.; JAGANNATH, P. *In Silico* docking studies of lipoxygenase inhibitory activity of commercially available flavonoids. *Journal of Computational Methods in Molecular Design*, v. 1, n. 4, p. 65-72, 2011.
- MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: _____. *Cosmetologia: com questões de avaliação*. Rio de Janeiro: Rubio, 2000. p. 33-42, 61-145.
- MASSAELI, H., SOBRATTEE, S., PIERCE, G. N. The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1524–1530, 1999.
- MCDUGALL, G. J.; KULKARNI, N. N.; STEWART, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, v. 115, n. 1, p.193-199, 2009.
- MELLOU, F.; LOUTRARI, H.; STAMATIS, H.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F. N. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2029-2034, 2006.
- MELLOU, F.; LAZARI, D.; SKAL TSA, H.; TSELEPIS, A.; KOLISIS, F.; STAMATIS, H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*, v. 116, p. 295-304, 2005.
- MEOTTI, F. C.; SENTHILMOHAN, R.; HARWOOD, D. T.; MISSAU, F. C.; PIZZOLATTI, M. G.; KETTLE, A. J. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: implications for the

pharmacological effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 44, n. 1, p. 109-120, 2008.

MILISAVLJEVIC, A.; STOJANOVIC, M.; CAREVIC, M.; MIHAILOVIC, M.; VELICKOVIC, D.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D. Lipase-catalyzed esterification of phloridzin: acyl donor effect on enzymatic affinity and antioxidant properties of esters. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 53, n. 43, p. 16644–16651, 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MOON, Y.J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, v. 20, p. 187-210, 2006.

MOON, Y. H.; LEE, S. M.; HA, S. H.; KOO, Y-M. Enzyme-catalyzed reactions in ionic liquids. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n. 2, p. 247-263, 2006a.

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

MORENO, D. A.; ILIC, N.; POULEV, A.; BRASAEMELE, D. L.; FRIED, S. K.; RASKIN, I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, v. 19, n. 10, p. 876-879, 2003.

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

MURUGESAN, S.; PANNERSELVAM, A.; TANGAVELU, A. C. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the leaves of *Memecylon umbellatum* burm. F. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 01, p. 42-45, 2011.

MUZNA, S.; DIVYA, D.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. Antifungal activity of lipase modified flavonoids from *Citrus limetta*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 116-118, 2014.

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

NAIR, S. V. G.; ZIAULLAH, RUPASINGHE, H. P. V. Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. e107149; 2014.

NAKAI, M.; FUKUI, Y.; ASAMI, S.; TOYODA-ONO, Y.; IWASHITA, T.; SHIBATA, H.; MITSUNAGA, T.; HASHIMOTO, F.; KISO, Y. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 11, p. 4593-4598, 2005.

NAKAJIMA, N.; ISHIHARA, K.; ITOH, T.; FURUYA, T.; HAMADA, H. Lipase catalysed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 61, p. 1926-1928; 1999.

NGUYEN, M. T.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; UEDA, J. Y.; TRAN, Q. L.; KADOTA, S. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*. *Planta Medica*, v. 72, n. 1, p. 46-51, 2006.

NIELSEN, I. L. F.; CHEE, W. S. S.; POULSEN, L.; OFFORD-CAVIN, E.; RASMUSSEN, S. E.; FREDERIKSEN, H.; ENSLEN, M.; BARRON, D.; HORCAJADA, M-N.; WILLIAMSON, G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in

humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 404-408, 2006.

OLIVEIRA, S. *Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimioluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis*. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PAL, H C.; DIAMOND, A. C.; STRICKLAND, L. R.; KAPPES, J. C.; KATIYAR, S. K.; ELMETS, C. A.; ATHAR, N.; AFAK, F. Fisetin, a dietary flavonoid, augments the anti-invasive and anti-metastatic potential of sorafenib in melanoma. *Oncotarget*, v. 7, p. 1227-1241, 2015.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 1, p. 93-99, 2006.

PARAVICIN, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, v. 31, p. 171-180, 2008.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*, v. 29, p. 323-331, 2014.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Improved preparation and use of room temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *Journal of Organic Chemistry*, v. 66, p. 8395-8401, 2001.

PASSICOS, E.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 1073-1076, 2004.

PATTI, A.; PIATTELLI, M.; NICOLOSI, G. Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 577-582, 2000.

PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; THIRION, A.; DE BRUYN-DISTER, M.; GOUTIER, R. Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin. Comparison with three related compounds. *Experientia*, v. 44, p. 450-453, 1988.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, p. 67-80, 1998.

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

PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v. 82, p. 513-523, 2011.

PROESTOS, C.; BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G-J. E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 95, p. 664-671, 2006.

RAHIM, A. T. M. A.; TAKAHASHI, Y.; YAMAKI, K. Mode of pancreatic lipase inhibition by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols. *Food Research International*, v. 75, p. 289-294, 2015.

RAMASWAMY, A. S.; JAYARAMAN, S.; SIRSI, M.; RAO, K. H. Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoids. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 10, p. 72-73, 1972.

- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Absorção e distribuição das drogas. In: _____. *Farmacologia*, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 51-77.
- RAO, R. J.; TIWARI, A. K.; KUMAR, U. S.; REDDY, S. V.; ALIB, A. Z.; RAOA, J. M. Novel 3-O acyl mesquitol analogues as free-radical scavengers and enzyme inhibitors: synthesis, biological evaluation and structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, p. 2777–2780, 2003.
- RASHED, K.; BUTNARIU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Bauhinia racemosa* Lam. and chemical content. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 3, p. 1073-1080, 2014.
- RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KAHKONEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, V.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, v. 56, p. 3–12, 2000.
- RAZAK, N. N. A.; ANNUAR, M. S. M. Enzymatic Synthesis of Flavonoid Ester: Elucidation of Its Kinetic Mechanism and Equilibrium Thermodynamic Behavior. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 54, p. 5604-5612, 2015.
- REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O. M. M.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry*, v. 69, n. 8, p. 1739-1744, 2008.
- ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 91, n. 1, p. 12-19, 2007.
- RUDDOCK, P. S.; CHARLAND, M.; RAMIREZ, S.; LÓPEZ, A.; TOWERS, G. H. N.; ARNASON, J.; LIAO, M.; DILLON, J. A. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 38, n. 2, p. 82-88, 2011.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical*, v. 125, p. 1-4, 2006.
- SALAS, M. P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S. L. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1411–1415, 2011.
- SALEM, J. H.; CHEVALOT, I.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; PARIS, C.; FICK, M.; HUMEAU, C. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Ach. and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, v. 124, p. 486-494, 2011.
- SALEM, J. H.; HUMEAU, C.; CHEVALOT, I.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; VANDERESSE, R.; BLANCHARD, F.; FICK, M. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 382-389, 2010.
- SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, G. *Methods in polyphenol analysis*. London: Royal Society of Chemistry, 2003. 383 p.
- SAVU, O.; SERAFINCEANU, C.; GRAJDEANU, I. V.; IOSIF, L.; GAMAN, L.; STOIAN, I. Paraoxonase lactonase activity, inflammation and antioxidant status in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus. *The Journal of International Medical Research*, v. 42, p. 523-529, 2014.

- SELLOUM, L.; REICHL, S.; MÜLLER, M.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 395, p. 49-56, 2001.
- SHAH, S. M. M.; KHAN, F. A.; SHAH, S. M. H.; CHISHTI, K. A.; PIRZADA, S. M. S. S.; KHAN, M. A. K.; FARID, A. Evaluation of phytochemicals and antimicrobial activity of white and blue capitulum and whole plant of *Silybum marianum*. *World Applied Sciences Journal*, v. 12, n. 8, p. 1139-1144, 2011.
- SHARMA, A.; TYAGI, S.; NAG, R.; CHATURVEDI, A.; NAG, T. N. Antimicrobial activity and cellular toxicity of flavonoid extracts from *Pongamia pinnata* and *Vitex negundo*. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 16, n. 4, p. 6396-6400, 2011.
- SHARMA, S.; ALI, A.; ALI, J.; SAHNI, J. K.; BABOOTA, S. RUTIN: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 22, p. 1063-79, 2013.
- SHIBA, Y.; KINOSHITA, T.; CHUMAN, H.; TAKETANI, Y.; TAKEDA, E.; KATO, Y.; NAITO, M.; KAWABATA, K.; ISHISAKA, A.; TERAOKA, J.; KAWAI, Y. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, n. 8, p. 1600–1609, 2008.
- SMITH, M. L.; MURPHY, K.; DOUCETTE, C. D.; GREENSHIELDS, A. L.; HOSKIN, D. W. The dietary flavonoid fisetin causes cell cycle arrest, caspase-dependent apoptosis, and enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in triple-negative breast cancer cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 117, p. 1913-1925, 2016.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Organic Chemistry*. 7^a. ed. New York: Wiley, 2001. 242 p.
- STEVENSON, D. E.; WIBISONO, R.; JENSEN, D. J.; STANLEY, R. A.; COONEY, J. M. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1236-1241, 2006.
- SUGIYAMA, H.; AKAZOME, Y.; SHOJI, T.; YAMAGUCHI, A.; YASUE, M.; KANDA, T. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 4604-4609, 2007.
- TAMIL S. A.; DINESH, M. G.; SATYAN, R. S.; CHANDRASEKAN, B.; ROSE, C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 1, n. 9, p. 116-120, 2011.
- TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.
- TERESCHUK, M. L.; RIERA, M. V.; CASTRO, G. R.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, p. 227–32, 1997.
- THEODOSIOU, E.; LOUTRARI, H.; STAMATIS, H.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F. N. Biocatalytic synthesis and antitumor activities of novel sylibin acylated derivatives with dicarboxylic acids. *New Biotechnology*, v. 28, p. 342-348, 2011.
- THILAKARATHNA, S. H.; RUPASINGHE, H. P. V. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, v. 5, p. 3367-3387, 2013.

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

TREVAN, M. D. *Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology*. 1^a ed. London: John Wiley & Sons, 1980. 138 p.

TSAO, T. F.; NEWMAN, M. G.; KWOK, Y. Y.; HORIKOSHI, A. K. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *Journal of Dental Research*, v. 61, p. 1103–1106, 1982.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 50, p. 27–34, 1996.

VALLEJO, F.; LARROSA, M.; ESCUDERO, E.; ZAFRILLA, M. P.; CERDÁ, B.; BOZA, J.; GARCÍA-CONESA, M. T.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 6516-6524, 2010.

VAN HOORN, D. E. C.; NIJVELDT, R. J.; VAN LEEUWEN, P. A. M.; HOFMAN, Z.; M'RABET, L.; DE BONT, D. B. A.; VAN NORREN, K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, v. 451, p. 111-118, 2002.

VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews*, v. 107, n. 6, p. 2757-2785, 2007.

VATS, S.; TIWARI, R.; ALAM, A.; BEHERA, K. K.; PAREEK, R. Evaluation of phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *in vitro* culture of *Vigna unguiculata* L. Walp. *Researcher*, v. 4, n. 11, p. 70-74, 2012.

VAYALIL, P. K.; MITTAL, A.; HARA, Y.; ELMETS, C. A.; KATIYAR, S. K. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 122, n.6, p. 1480-1487, 2004.

VILA, F. C. *Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar*. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VISKUPICOVA, J.; MAJEKOVA, M.; HORAKOVA, L. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1) by rutin derivatives. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 36, p. 183–194, 2015.

VISKUPICOVA, J.; MALIAR, T.; PSENAKOVA, I.; STURDIK, E. Enzymatic acylation of naringin. *Nova Biotechnologica*, v. 6, p. 149-159, 2006.

VISKUPICOVA, J.; ONDREJOVIC, M. Effect of fatty acid chain length on enzymatic esterification of rutin. In: 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE OF APPLIED NATURAL SCIENCES, 2007, Trnava. *1st International Conference of Applied Natural Sciences – Book of Abstracts*. Trnava, Slovakia. 2007, p. 59.

VISKUPICOVA, J.; ONDREJOVIC, M.; MALIAR, T. Enzyme-mediated preparation of flavonoid esters and their applications. *Biochemistry*, v. 10, p. 263-278, 2012.

VISKUPICOVA, J.; ONDREJOVIC, M.; STURDIK, E. The potential and practical applications of acylated flavonoids. *Pharmazie*, v. 64, p. 355-360, 2009.

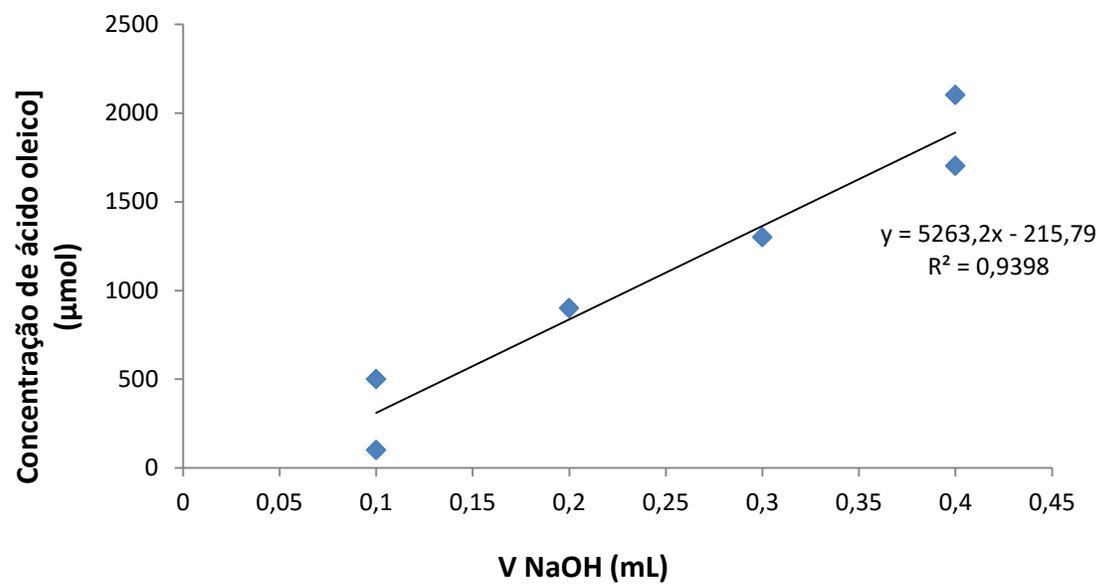
- VISKUPICOVA, J.; DANIHELOVA, M.; ONDREJOVIC, M.; LIPTAJ, T.; STURDIK, E. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. *Food Chemistry*, v. 123, p. 45-50, 2010.
- WARNAKULASURIYA, S. N.; ZIAULLAH, RUPASINGHE, H. P. V. Long chain fatty acid acylated derivatives of quercetin-3-O-glucoside as antioxidants to prevent lipid oxidation. *Biomolecules*, v. 4, p. 980-993, 2014.
- WANG, Y.; CHAN, F. L.; CHEN, S.; LEUNG, L. K. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sciences*, v. 77, p. 39-51, 2005.
- WEBSTER, R. P.; GAWDE, M. D.; BHATTACHARYA, R. K. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Letters*, v. 109, p. 185–191, 1996.
- WENG, C-J.; YEN, G-C. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive *in vitro* anti-invasive and *in vivo* anti-metastatic activities. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 31, p. 323-351, 2012.
- WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glucogen hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 138, p. 663-670, 1979.
- WOOD, R. J. Bioavailability. In: CABALLERO, B.; PRENTICE, A.; ALLEN, L. (Eds.) *Encyclopedia of human nutrition*. 2^a ed. Oxford: Elsevier, 2005. p. 195-201.
- WU, T., GUAN, Y.; YE, J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1573-1579, 2007.
- XANTHAKIS, E.; THEODOSIOU, E.; MAGKOUTA, S.; STAMATIS, H.; LOUTRARI, H.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F. Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids: structural and functional diversity of the novel derivatives. *Pure and Applied Chemistry*, v. 82, p. 1-16, 2010.
- XAVIER, C. R. *Associação da isoflavona genisteína com beta-ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea*. 2006. 149 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- XU, J.; QIAN, J.; LI, S. Enzymatic acylation of isoorientin isolated from antioxidant of bamboo leaves with palmitic acid and antiradical activity of the acylated derivatives. *European Food Research and Technology*, v. 239, p. 661-667, 2014.
- YAMADA, K., U. OTA, H. MACHIDA. Studies on the production of lipase by microorganisms. Quantitative determination of lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 26, p. 63-69, 1962.
- YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT – Food Science and Technology*, v. 41, p. 1060–1066, 2008.
- ZHAO, C. Y.; SHI, Y. M.; WANG, W. F.; JIA, Z. J.; YAO, S. D.; FAN, B. T. Fast repair of deoxythymidine radical anions by two polyphenols: rutin and quercetin. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, p. 1967–1971, 2003.
- ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 37, p. 16–25; 2005.

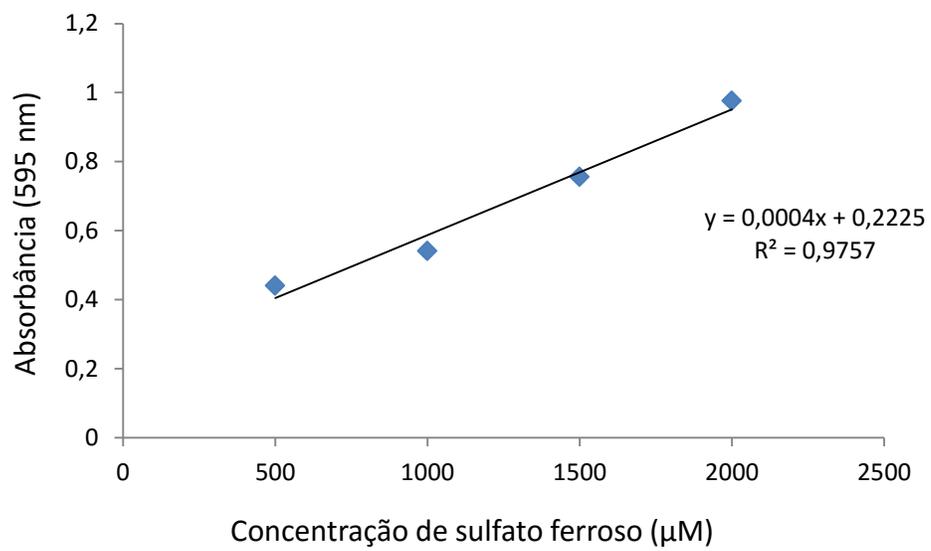
ZHU, S.; LI, Y.; LI, Z.; MA, C.; LOU, Z.; YOKOYAMA, W.; WANG, H. Lipase-catalyzed synthesis of acetylated EGCG and antioxidant properties of the derivatives. *Food Research International*, v. 56, p. 279-286, 2014.

ZIAULLAH; BHULLAR, K. S.; WARNAKULASURIYA, S. N.; RUPASINGHE, H. P. V. Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant capacity and tyrosinase inhibition activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 684-692, 2013.

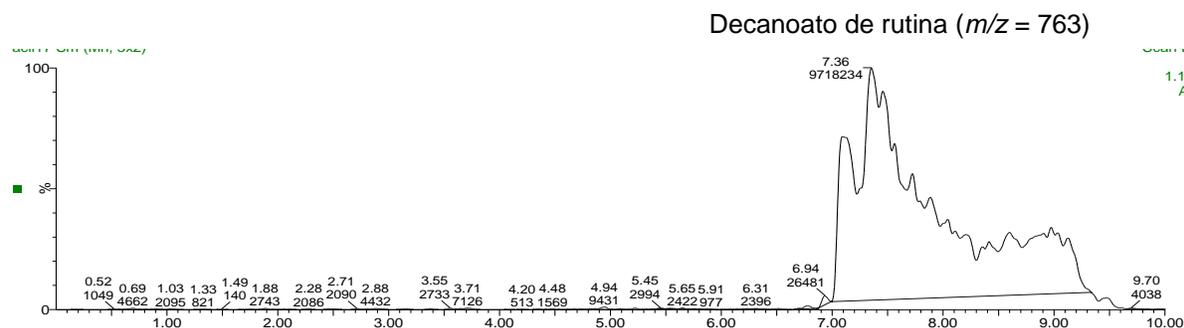
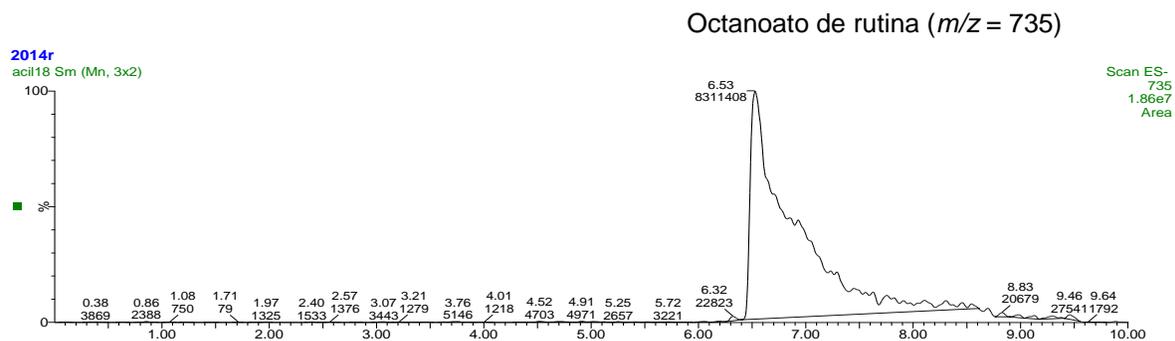
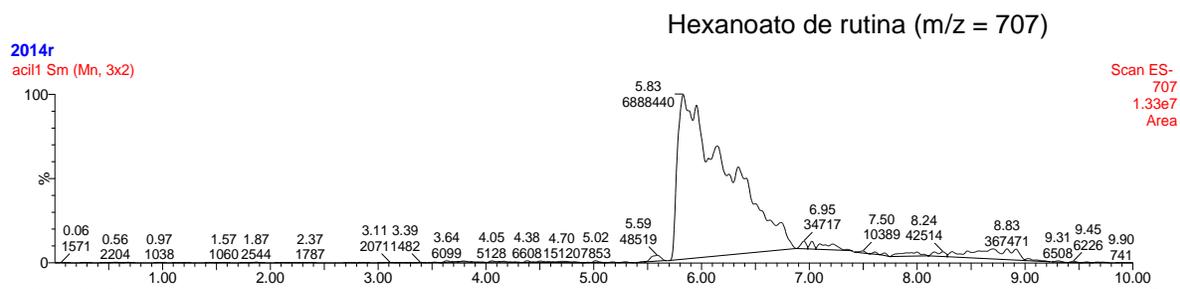
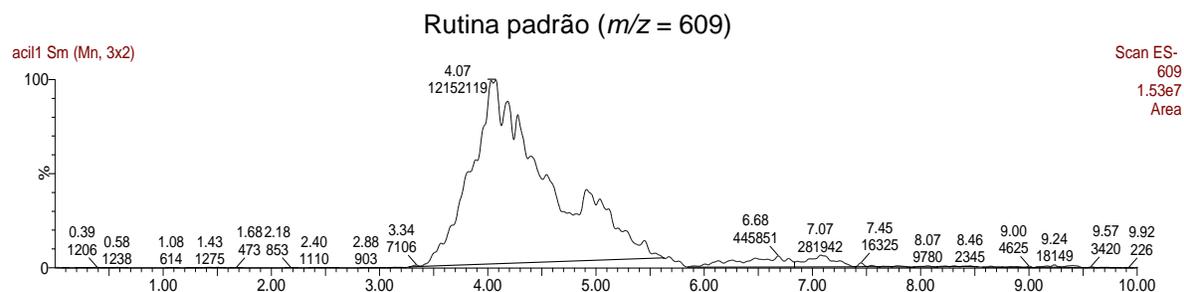
7. APÊNDICES

Apêndice I: Curva-padrão de titulação do ácido oleico com NaOH 0,1 M.

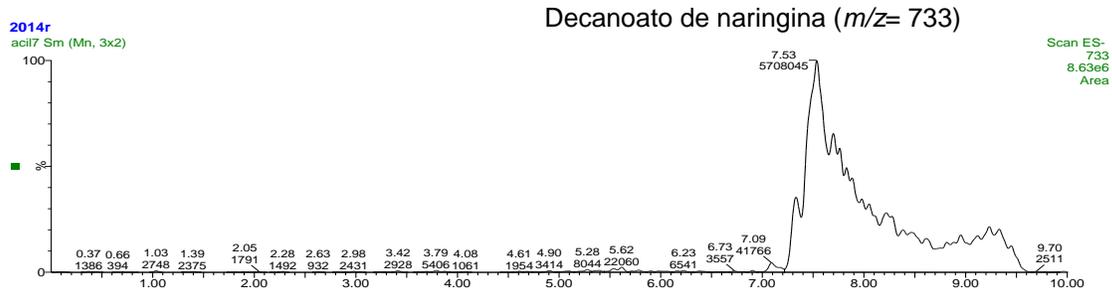
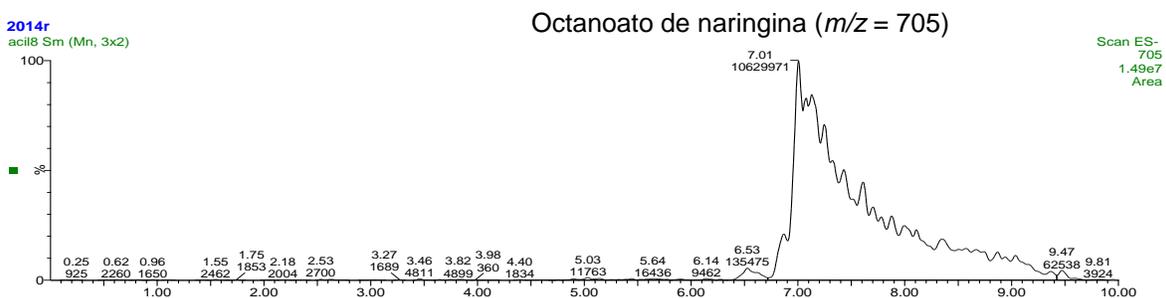
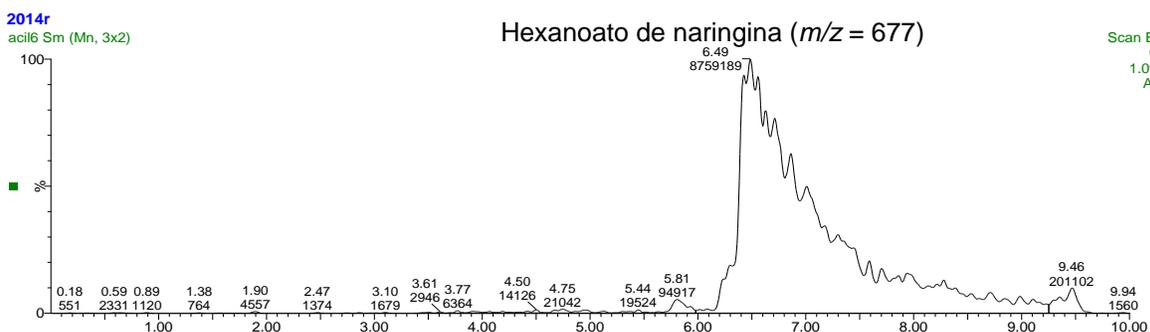
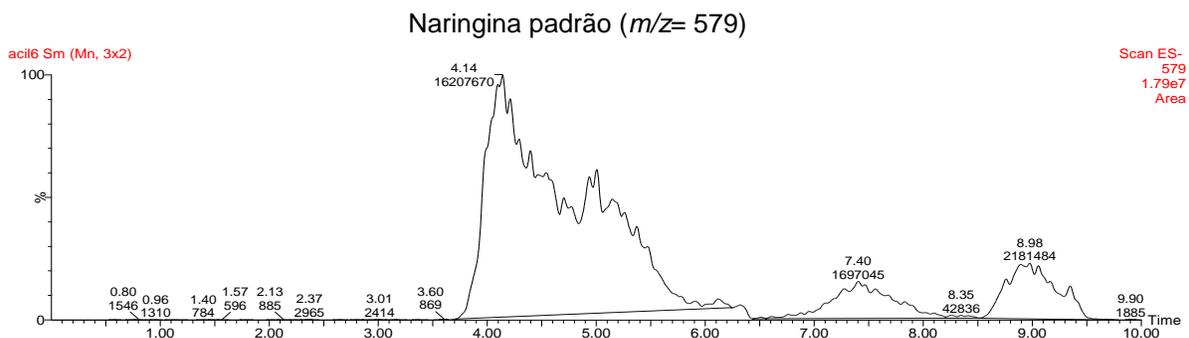


Apêndice II: Curva padrão de sulfato ferroso

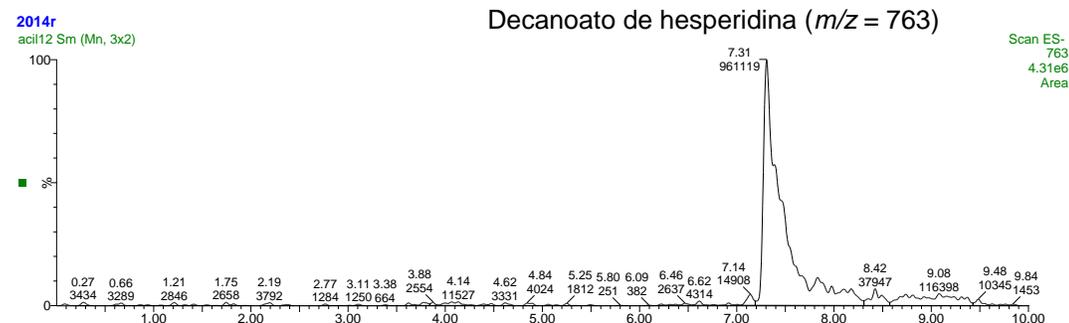
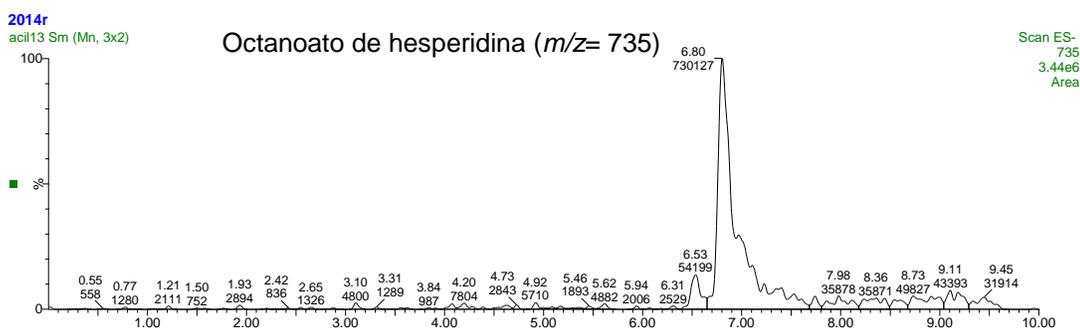
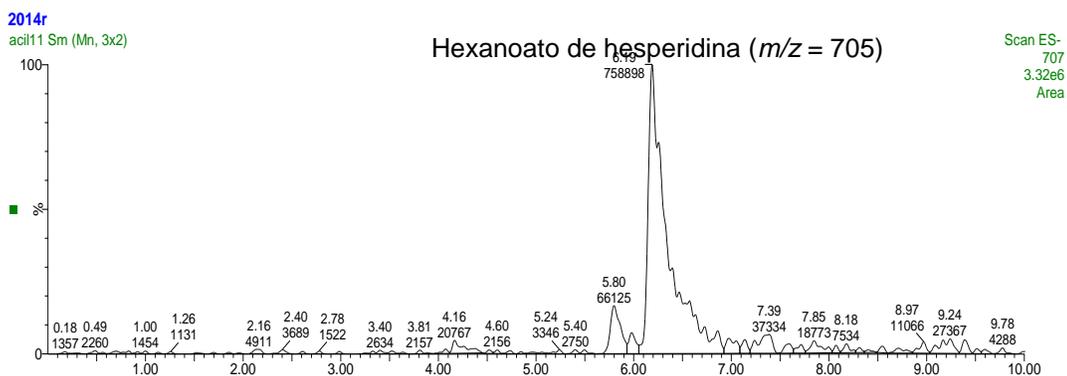
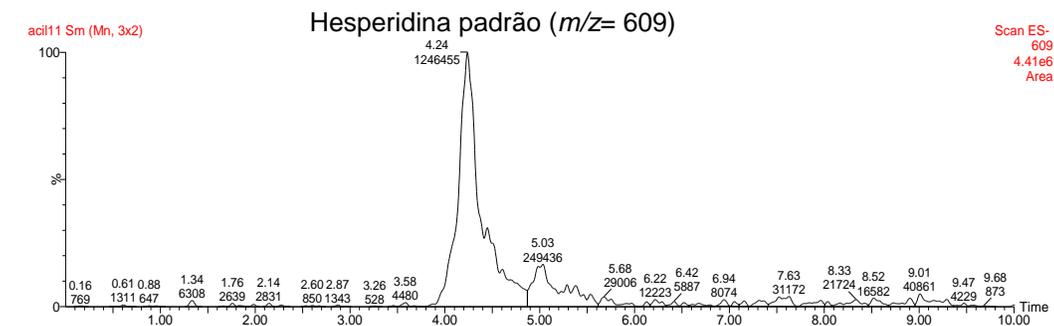
Apêndice III: Cromatogramas das amostras de rutina padrão e seus derivados obtidos por acilação catalisada pela CALB com diferentes ácidos graxos (hexanoico, octanoico e decanoico).

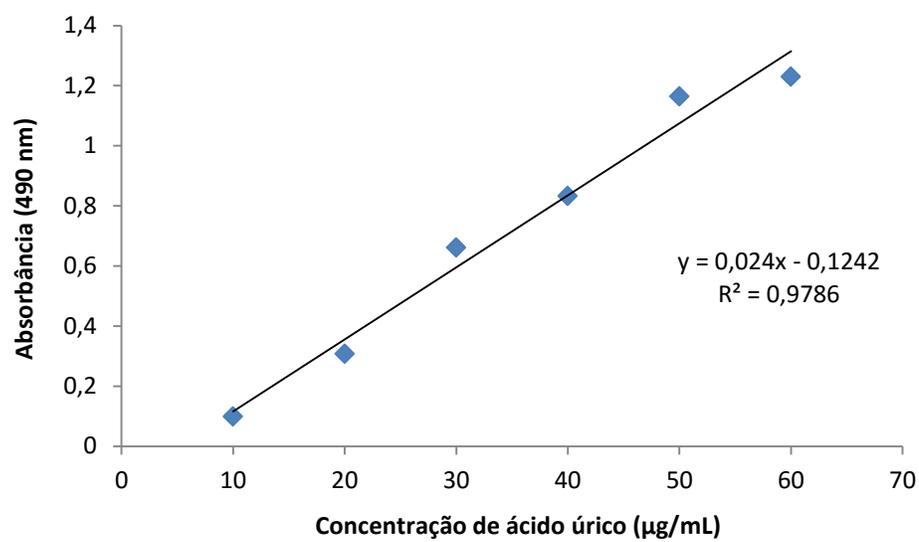


Apêndice IV: Cromatogramas das amostras de naringina padrão e seus derivados obtidos por acilação catalisada pela CALB com diferentes ácidos graxos (hexanoico, octanoico e decanoico).



Apêndice V: Cromatogramas das amostras de hesperidina padrão e seus derivados obtidos por acilação catalisada pela CALB com diferentes ácidos graxos (hexanoico, octanoico e decanoico).



Apêndice VI: Curva padrão de ácido úrico.

Apêndice VII: Curva padrão do p-nitrofenol.