

Filipa Isabel Félix Barradas

Semi-síntese de novos derivados flavonóides bioactivos.
Estudo de reações de acilação e desacilação regioselectivas recorrendo a
lipases como catalisadores.



Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

2013

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra para obtenção do grau de
Mestre em Química Farmacêutica Industrial

Trabalho desenvolvido sob orientação científica de Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva e Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva, orientadora deste trabalho, um agradecimento especial pela confiança que depositou em mim e pela orientação científica da presente dissertação. A disponibilidade e o empenho que sempre demonstrou foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho. É para mim um privilégio enorme ser merecedora da sua confiança e da sua amizade. Agradeço ainda, o apoio, o incentivo e o otimismo que sempre me deu e a revisão crítica do presente texto.

Ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, orientador deste trabalho, agradeço a oportunidade que me deu em trabalhar num projeto tão interessante e estimulante.

À Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo, agradeço a amizade, o apoio e o incentivo que me deu nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Aos meus amigos que de uma forma ou de outra me foram apoiando fica aqui a minha gratidão.

À D. Graça Santiago agradeço a amizade, a força e o incentivo constantes.

Agradeço ainda a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha Avó Alzira, sempre presente em tudo o que faço e em tudo o que sou!

À minha família, em particular aos meus pais, irmã e sobrinhas, que são a minha força e o meu porto seguro!

Às minhas sobrinhas Matilde e Mariana, que são únicas e especiais!

ÍNDICE GERAL

Abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de tabelas.....	XI
Resumo	XIII
Abstract.....	XV

CAPÍTULO 1

1. Introdução Geral	3
1.1. Compostos polifenólicos naturais	3
1.2. Classificação dos compostos polifenólicos	5
1.3. Atividade antioxidante dos flavonóides e do resveratrol	8
1.4. Outras atividades biológicas dos flavonóides e do resveratrol	15
1.5. Modificações sintéticas de compostos polifenólicos para aumentarem a atividade biológica	23
2. Biocatálise.....	29
2.1. Biocatálise	29
2.2. Classes de enzimas	31
2.2.1. Hidrolases:Lipases	34
2.3. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases	36

2.4. Seletividade das enzimas.....	38
2.5. Biocatálise em meio orgânico	43

CAPÍTULO 2

2. Objetivos da tese.....	51
---------------------------	----

CAPÍTULO 3

3. Resultados e discussão.....	55
3.1. Rastreio de solventes e enzimas.....	55
3.2. Acilações enzimáticas regioselectivas.....	56
3.2.1. Acilação enzimática da crisina.....	57
3.2.2. Acilação enzimática da naringenina.....	58
3.2.3. Acilação enzimática da naringina	67
3.2.4. Acilação enzimática do resveratrol	75
3.3. Estudo de reações de alcoólise enzimática em substratos polifenólicos acilados	97
3.3.1. Acilações químicas.....	97
3.3.1.1. Síntese da naringenina per-acilada.....	97
3.3.1.2. Síntese do resveratrol per-acilado	100
3.3.2. Alcoólises enzimáticas	104
3.3.2.1. Alcoólise enzimática da naringenina.....	104
3.3.2.2. Alcoólise enzimática do resveratrol	105

CAPÍTULO 4

4. Conclusões	109
---------------------	-----

CAPÍTULO 5

5. Parte experimental	115
5.1. Instrumentação	115
5.2. Cromatografia	116
5.3. Reagentes e solventes	116
5.4. Acilações enzimáticas	117
5.4.1. Acilação enzimática da naringenina	117
5.4.2. Acilação enzimática da naringina	119
5.4.3. Acilação enzimática do resveratrol	120
5.5. Acilações químicas	126
5.5.1. Síntese da naringenina per-acilada	126
5.5.2. Síntese do resveratrol per-acilado	127
5.6. Alcoólises enzimáticas	129
5.6.1. Alcoólise enzimática da naringenina	129
5.6.2. Alcoólise enzimática do resveratrol	130

CAPÍTULO 6

6. Bibliografia	133
-----------------------	-----

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
Ca ²⁺	ião cálcio
CALB	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CCF	cromatografia em camada fina
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CR	lipase de <i>Candida rugosa</i>
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DEPT	transferência de polarização por aumento de distorção
DEPT 90	transferência de polarização por aumento de distorção com uma largura de impulso de 90°
DEPT 135	transferência de polarização por aumento de distorção com uma largura de impulso de 135°
4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
E°'	potencial de redução
EC	comissão de enzimas
FAD ⁺	flavina-adenina dinucleótido oxidado
FADH	flavina-adenina dinucleótido reduzido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogénio

IC ₅₀	concentração que inibe 50% da viabilidade celular
IV	infra-vermelho
J	constante de acoplamento
K ⁺	ião potássio
K _{cat}	número de turnover
K _M	constante de Michaelis-Menten
LDL	lipoproteína de baixa densidade
m	multiplete
NAD ⁺	nicotinamida-adenina dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido reduzido
NADP	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NADP ⁺	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reduzido
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NaHCO ₃	hidrogenocarbonato de sódio
nd	não determinado
NO·	radical oxido nítrico
O ₂	oxigénio molecular
O ₂ ⁻	anião superóxido
pf	ponto de fusão
PQQ	pirrolo-quinolina
PS	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>

ppm	partes por milhão
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de próton
RO·	radical hidróxilo
ROO·	radical peróxido
ROS	espécies reativas de oxigénio
rpm	rotações por minuto
s	singuleto
SCN	sistema central nervoso
t	triplete
THF	tetra-hidrofurano
TLC	cromatografia de camada fina
TMS	tetrametilsilano
UV	ultra-violeta

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides	5
Figura 2. Estruturas das principais classes de flavonóides	6
Figura 3. Estrutura básica dos estilbenos.....	7
Figura 4. Sequestro dos ROS (R [•]) pelos flavonóides.....	10
Figura 5. Estrutura orto-dihidroxi no anel C (Croft KD., 2006).....	11
Figura 6. Ligação dupla 2,3 conjugada com a função 4-oxo no anel B (Croft KD., 2006)	11
Figura 7. Grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 do anel A (Croft KD., 2006).....	11
Figura 8. Acilação enzimática regiosselectiva da naringina e da rutina (Mellou <i>et al.</i> , 2006).....	23
Figura 9. Esterificação enzimática crisoeriol-7- <i>O</i> - β -D- (3''-E-p-cumaroílo) (1), e crisoeriol-7- [6''-O-acetil- β -D-alosilo- (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido] (2) (Mellou <i>et al.</i> , 2005).....	24
Figura 10. Síntese da 6''-O-acil prunina	26
Figura 11. Acilação enzimática da silibina com ácidos dicarboxílicos (HOOC-R-COOH) catalisada pela Novozym 435 em solventes orgânicos	27
Figura 12. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases	37
Figura 13. Acilação enzimática da quercetina (1) e da isoquercetina (2) catalisada pela PS e pela CALB em acetonitrilo, acetona e álcool <i>tert</i> amílico usando acetato de vinilo como dador de acilo (Chebil <i>et al.</i> , 2007).....	41
Figura 14. Acilação regiosselectiva da naringina e da silibina catalisada pela CALB: ^a foi usada uma mistura de silibina A e silibina B (Mellou <i>et al.</i> , 2006 e de Gazak <i>et al.</i> , 2010)	42
Figura 15. Biotransformações de um éster em solventes orgânicos (Gotor-Fernández, 2006).....	44

Figura 16. Acilação enzimática de glucosil- flavonóides na presença de um ácido carboxílico ou de um éster vinílico como dadores de acilo(a) esterificação, (b) transesterificação (Chebil <i>et al.</i> , 2006)	46
Figura 17. Alcoólise catalisada por lipase num solvente orgânico.....	46
Figura 18. Estrutura da crisina.....	57
Figura 19. Estrutura da naringenina.....	59
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H da naringenina	61
Figura 21. Espectro de RMN ¹³ C da naringenina	62
Figura 22. Espectro DEPT 90/135 da naringenina	62
Figura 23. Espectro de RMN ¹ H do produto da acilação enzimática da naringenina.....	63
Figura 24. Espectro de RMN ¹³ C do produto da acilação enzimática da naringenina	64
Figura 25. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática da naringenina.....	64
Figura 26. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática da naringenina.....	65
Figura 27. Espectro de infra-vermelho do produto de acilação enzimática da naringenina	65
Figura 28. Representação esquemática da acilação enzimática da naringenina com Novozym 435 e acetato de vinilo.....	66
Figura 29. Estrutura da naringina	68
Figura 30. Espectro RMN ¹ H da naringina.....	69
Figura 31. Espectro RMN ¹³ C da naringina.....	70
Figura 32. Espectro DEPT 90 da naringina	71
Figura 33. Espectro DEPT 135 da naringina	71
Figura 34. Espectro RMN ¹ H do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo	72

Figura 35. Espectro RMN ¹³ C do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo	73
Figura 36. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo	73
Figura 37. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo	74
Figura 38. Representação esquemática da acilação enzimática da naringina com Novozym 435 e acetato de vinilo.....	74
Figura 39. Estrutura do resveratrol	75
Figura 40. Espectro RMN ¹ H do resveratrol.....	77
Figura 41. Espectro RMN ¹³ C do resveratrol	78
Figura 42. Espectro DEPT 90/135 do resveratrol.....	79
Figura 43. Espectro RMN ¹ H do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo.....	80
Figura 44. Espectro RMN ¹³ C do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo.....	81
Figura 45. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo.....	81
Figura 46. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo.....	82
Figura 47. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com Novozym 435 e acetato de vinilo.....	82
Figura 48. Espectro RMN ¹ H do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo	83
Figura 49. Espectro RMN ¹³ C do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo	84
Figura 50. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo	85

Figura 51. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo	85
Figura 52. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo	86
Figura 53. Espectro RMN ¹ H do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo.....	87
Figura 54. Espectro RMN ¹³ C do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo.....	88
Figura 55. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo.....	88
Figura 56. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo.....	89
Figura 57. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com Novozym 435 e butirato de vinilo	89
Figura 58. Espectro RMN ¹ H do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo.....	90
Figura 59. Espectro RMN ¹³ C do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo.....	91
Figura 60. Espectro DEPT 90 do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo.....	92
Figura 61. Espectro DEPT 135 do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo.....	92
Figura 62. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo	93
Figura 63. Espectro RMN ¹ H do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com CALB e decanoato de vinilo	94
Figura 64. Espectro RMN ¹³ C do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com CALB e decanoato de vinilo	95
Figura 65. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com Novozym 435 e decanoato de vinilo.....	96

Figura 66. Espectro RMN ^1H do produto da acilação química da naringenina.....	98
Figura 67. Espectro RMN ^{13}C do produto da acilação química da naringenina.....	98
Figura 68. Espectro DEPT 90 do produto da acilação química da naringenina	99
Figura 69. Espectro DEPT 135 do produto da acilação química da naringenina	99
Figura 70. Representação esquemática da acilação química da naringenina	100
Figura 71. Espectro de RMN ^1H do produto da acilação química do resveratrol.....	101
Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C do produto da acilação química do resveratrol	102
Figura 73. Espectro DEPT 90 do produto da acilação química do resveratrol.....	102
Figura 74. Espectro DEPT 135 do produto da acilação química do resveratrol.....	103
Figura 75. Representação esquemática da acilação química do resveratrol.....	103

Índice de tabelas

Tabela 1. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática da crisina usando acetato de vinilo como dador de acilo57

Tabela 2. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática da naringenina usando acetato de vinilo como dador de acilo59

Tabela 3. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática do resveratrol usando acetato de vinilo como dador de acilo76

Tabela 4. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática do resveratrol usando cinamato de vinilo como dador de acilo96

Tabela 5. Otimização das condições de reação para a alcoólise da naringenina 104

Tabela 6. Otimização das condições de reação para a alcoólise do resveratrol..... 105

Resumo

Os compostos polifenólicos são importantes entre os produtos naturais pois possuem várias atividades biológicas, principalmente atividade antioxidante. No entanto, a sua baixa estabilidade e solubilidade em meio lipofílico, dificulta o seu uso na indústria farmacêutica.

A acilação enzimática regioselectiva usando lipases tem sido sugerida como um caminho interessante e promissor para melhorar as propriedades dos compostos polifenólicos porque não altera a sua atividade biológica.

Neste trabalho realizou-se a semi-síntese de novos derivados bioativos através de reações de acilação e desacilação regioselectivas recorrendo a lipases como catalisadores. Foi possível observar que a seletividade e a velocidade da reação são dependentes da estrutura do substrato, do solvente e da enzima.

Após otimização das condições reacionais, foram isolados derivados acilados do resveratrol, da naringenina e do seu derivado glicosilado, a naringina.

Abstract

The polyphenolic compounds are important among the natural products because they have several biological activities, mainly antioxidant activity. However, their low stability and solubility in lipophilic hampers its use in the pharmaceutical industry.

The regioselective enzymatic acylation using lipases has been suggested as an interesting and promising way to improve the properties of polyphenolic compounds because not affects their biological activity.

In this work the semi-synthesis of new bioactive derivatives by acylation and deacylation reactions regioselectivs using lipases as catalysts was performed. It was observed that the selectivity and reaction rate are dependent on the structure of the substrate, the solvent and the enzyme.

After optimization of reaction conditions, were isolated acylated derivatives of resveratrol, naringenin and its glycosylated derivative, naringin.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução Geral

1.1. Compostos polifenólicos naturais

Os compostos polifenólicos são compostos de interesse biológico com um ou mais anéis aromáticos e no mínimo com dois grupos hidroxilo.

Estes compostos são os antioxidantes mais abundantes na dieta. No entanto, não são necessariamente os mais ativos no organismo humano, quer porque têm baixa atividade intrínseca, ou porque são pouco absorvidos, altamente metabolizados ou rapidamente eliminados (Manach *et al.*, 2004).

As principais fontes de polifenóis são as frutas, os vegetais, as bebidas como o vinho, o café, o chá e os sumos de fruta, o chocolate e outros produtos do cacau e os cereais (Vinson *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2004; Scalbert *et al.*, 2005; Naczka e Shadidi, 2006; Dimitrios, 2006; D'Archivio *et al.*, 2007).

Nos alimentos, os polifenóis são os principais responsáveis pelas características organolépticas tais como adstringência, amargura e aroma.

Como antioxidantes, os polifenóis podem proteger as células contra danos oxidativos e portanto limitar o risco de várias doenças degenerativas associadas ao *stress* oxidativo. Estudos experimentais, suportam fortemente o papel dos polifenóis na prevenção das doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas (Manach *et al.*, 2004; Scalbert *et al.*, 2005; D'Archivio *et al.*, 2007).

Atualmente estes compostos recebem muita atenção devido aos seus efeitos benéficos na saúde relacionados não só com as suas propriedades antioxidantes (Vinson

et al., 2005; Dehkharghanian *et al.*, 2009), assim como as suas propriedades anti-inflamatórias (Nicholas e Katiyar, 2010), cardioprotetoras (Zen e Fernandez, 2005), preventivas do cancro (Castillo-Pichardo *et al.*, 2009, Nicholas e Katiyar, 2010) e neuroprotetoras (Aquilano *et al.*, 2008).

Devido às várias atividades biológicas que estes compostos exercem, alguns deles são compostos *lead* no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos (Prochazkova *et al.*, 2011; Gutierrez-Merino *et al.*, 2011).

Assim, a modificação das estruturas destes compostos, pode levar à descoberta de novos derivados bioativos.

1.2. Classificação dos compostos polifenólicos

Os compostos polifenólicos são classificados em várias classes em função do número de anéis fenólicos que têm e dos elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros (Manach *et al.*, 2004; D'Archivio *et al.*, 2007; Ignat *et al.*, 2011).

Aprofundam-se apenas as duas classes de polifenóis usadas na realização deste trabalho, os flavonóides e os estilbenos.

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular e a estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo flavano, constituído por quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e C) e um pirano (cadeia heterocíclica B) acoplado ao anel A (figura 1). Os anéis A e C são hidróxilados e podem conter substituintes metoxílicos.

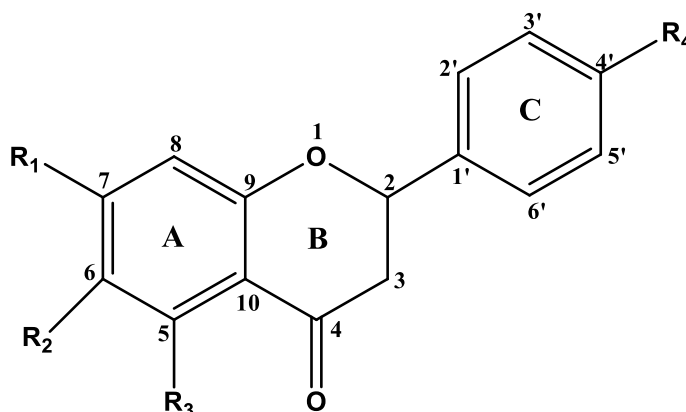
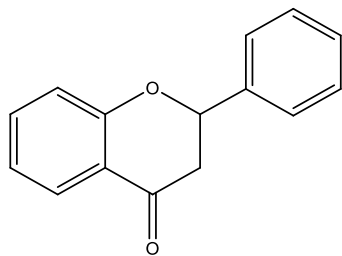


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides

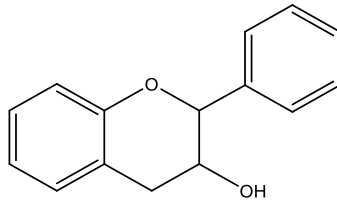
Os flavonóides podem ser divididos em subclasses em função do tipo de heterociclo envolvido. As estruturas químicas das principais famílias de flavonóides com

propriedades farmacológicas relevantes são realçadas na figura 2 (Gutierrez-Merino *et al.*, 2011). Brevemente:

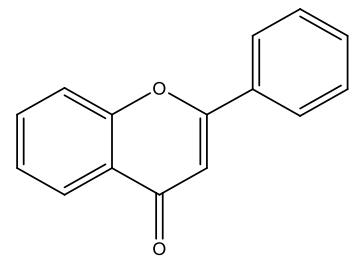
- a) Flavanonas, com um grupo carbonilo no C₄ do anel B.
- b) Flavanois, com um grupo hidroxilo no C₃ do anel B.
- c) Flavonas, com um grupo carbonilo no C₄ e uma dupla ligação entre C₂ e C₃ do anel B.
- d) Flavonois, com um grupo carbonilo no C₄, uma dupla ligação entre C₂ e C₃ e um grupo hidroxilo no C₃ do anel B.
- e) Antocianinas, catiões derivados de flavílio.
- f) Isoflavonóides, com o anel C ligado ao C₃ do anel B em vez de ligado ao C₂.



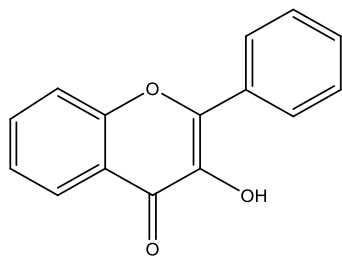
a) Flavanonas



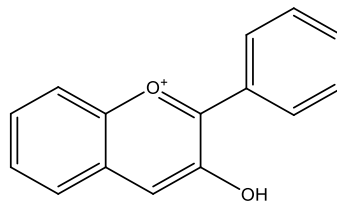
b) Flavanois



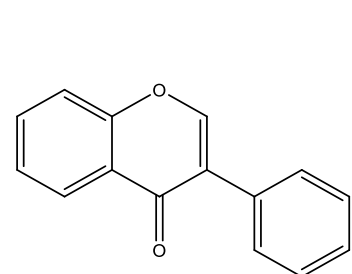
c) Flavonas



d) Flavonois



e) Antocianinas



f) Isoflavonas

Figura 2. Estruturas das principais classes de flavonóides

Os estilbenos são 1,2-diariletenos. O anel A normalmente tem dois grupos hidroxilo em posição meta, enquanto o anel B é substituído por grupos hidroxilo e metoxilo em posições orto, meta ou para (figura 3). As principais fontes de estilbenos são as uvas, o vinho e os amendoins.

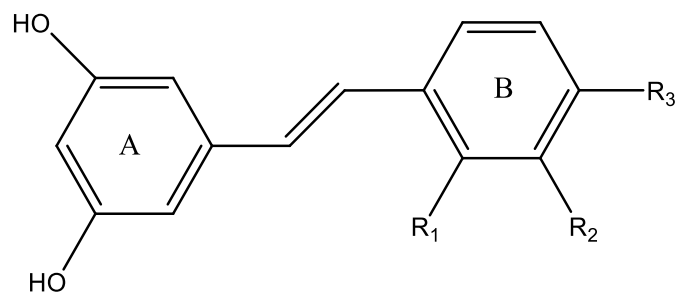


Figura 3. Estrutura básica dos estilbenos

1.3. Atividade antioxidante dos flavonóides e do resveratrol

Muitos compostos com grupos aromáticos são capazes de funcionar como antioxidantes por formarem radicais estáveis via estruturas de ressonância, prevenindo assim a oxidação contínua (King *et al.*, 2006).

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbica e do nosso metabolismo, já que o oxigênio é o último aceitador de elétrons no sistema de fluxo de elétrons que produz energia na forma de ATP. No entanto, o oxigênio é um oxidante muito forte, tornando-se impossível impedir oxidações secundárias desta molécula, que não estão envolvidas no metabolismo fisiológico e que podem ter consequências graves se não forem neutralizadas por um sistema antioxidante eficiente (Pietta, 2000).

O termo antioxidante foi definido por Halliwell e Gutteridge (1998) como “qualquer substância que atrasa, previne ou remove os danos oxidativos”. A função fisiológica destes compostos é prevenir o prejuízo dos componentes celulares que surgem como consequência das reações envolvendo radicais livres (Young *et al.*, 2001).

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS), incluem aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais peróxido (ROO^{\cdot}) e hidroxilo (RO^{\cdot}) e óxido nítrico (NO^{\cdot}).

Os ROS são moléculas altamente reativas constantemente produzidas pelas reações enzimáticas nas células. Em condições fisiológicas normais, os ROS são produzidos em níveis baixos, o que é necessário para manter as funções normais das

células, e os sistemas antioxidantes endógenos do organismo tem a capacidade de evitar os efeitos nocivos (Benavente-Garcia e J. Castillo, 2008).

No entanto, devido à eficiência incompleta dos nossos sistemas de defesa endógena e à existência de situações onde os ROS são produzidos em excesso (poluentes do ar, tabaco e fumo, radiação UV e alimentação rica em ácidos gordos altamente polinsaturados, inflamação, isquemia, etc.), são necessários antioxidantes alimentares para diminuir os efeitos cumulativos do dano oxidativo (Pietta, 2000).

Tem havido um interesse crescente em antioxidantes nos últimos anos. As vitaminas C, E, A e os carotenoides são antioxidantes bem estabelecidos. Nos anos 90 acumulou-se evidência de que os polifenóis são uma importante classe de antioxidantes.

As capacidades antioxidantes de muitos flavonóides são superiores às da vitamina C e E (Prior e Cao, 2000). Os flavonóides são capazes de sequestrar diretamente os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogénio. O radical livre fenoxilo, assim formado pode reagir com um segundo radical, adquirindo a estrutura de uma quinona estável, figura 4 (Pietta, 2000).

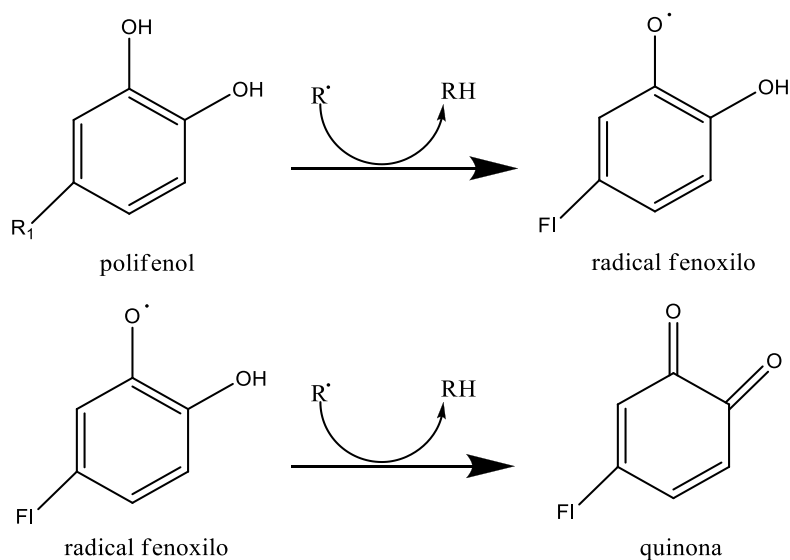


Figura 4. Sequestro dos ROS (R[•]) pelos flavonóides

A atividade dos flavonóides *in vitro* depende do arranjo dos grupos funcionais da sua estrutura principal. Quer a configuração quer o número de grupos hidroxilo influenciam substancialmente a atividade antioxidante destes compostos (Heim *et al.*, 2002).

As principais características estruturais dos flavonóides necessárias a uma neutralização eficiente de radicais livres de oxigénio são: a presença de uma estrutura orto-dihidroxilada (um grupo catecol no anel C), que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, já que contribui para a deslocalização eletrónica (figura 5); uma ligação dupla conjugada com a função 4-oxo no anel B; que aumenta a deslocalização eletrónica do anel C (figura 6); e grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 do anel A permitem ligações de hidrogénio ao grupo oxo do anel B (figura 7) (Pietta, 2000; Ross e Kasum, 2002; Merino *et al.*, 2011; Procházková *et al.*, 2011).

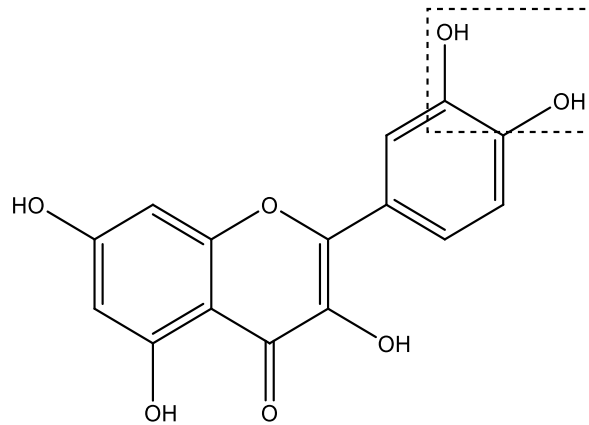


Figura 5. Estrutura orto-dihidroxi no anel C (Croft KD., 2006)

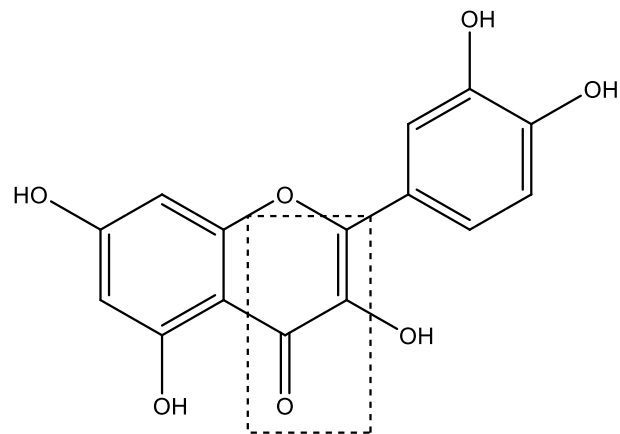


Figura 6. Ligação dupla 2,3 conjugada com a função 4-oxo no anel B (Croft KD., 2006)

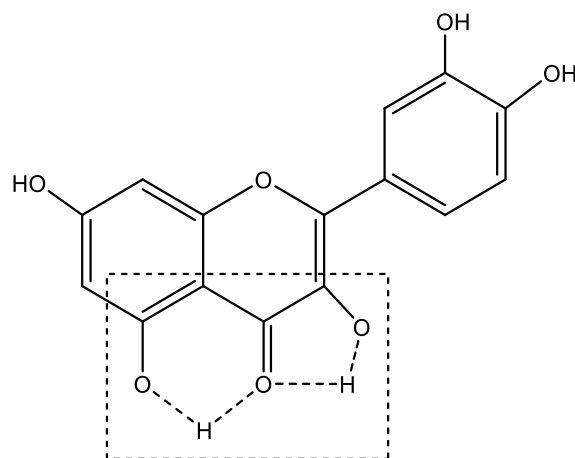


Figura 7. Grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 do anel A (Croft KD., 2006)

Para além do sequestro direto das espécies reativas de oxigénio, os flavonóides podem prevenir os danos causados pelos radicais livres através de outros mecanismos, tais como: a capacidade de ativar enzimas antioxidantes, a quelação de metais, a redução dos radicais α -tocoferilo, a inibição de oxidases, a atenuação do *stress* oxidativo causado pelo óxido nítrico, o aumento nos níveis de ácido úrico, o aumento nas propriedades antioxidantes de pequenos antioxidantes moleculares (Procházková *et al.*, 2011).

Assim como muitos antioxidantes, também os flavonóides podem agir, em certas circunstâncias, como pro-oxidantes e, por isso promover a oxidação de outros compostos (Procházková *et al.*, 2011).

Esta atividade pro-oxidante é supostamente baseada na soma de reações complexas que envolvem a reação entre o polifenol e o O_2 produzindo $O_2^{\cdot-}$, e a subsequente reação entre um segundo polifenol e o $O_2^{\cdot-}$, produzindo H_2O_2 . A primeira reação, a auto oxidação do polifenol, pode ocorrer sob certas condições embora seja termodinamicamente desfavorável ($E^{0'} O_2 / O_2^{\cdot-} = -330$ mV ou -160 mV). A segunda reação é energeticamente favorável ($E^{0'} O_2 / O_2^{\cdot-} = 940$ mV), mas como é controlada pela ocorrência da auto oxidação do polifenol, tem baixas possibilidades de ocorrer com grande extensão sob condições fisiológicas (Galleano *et al.*, 2010).

Ilhami Gulcin (2010) mostrou em vários ensaios *in vitro* que o resveratrol é um antioxidante eficaz quando comparado com os compostos antioxidantes mais comumente usados tais como o hidroxianisole butilado, hidroxitolueno butilado, α -tocoferol e trolox.

O resveratrol tem uma capacidade antioxidante intrínseca que pode ser relacionada com os seus efeitos quimiopreventivos. *In vitro*, a indução de enzimas de desintoxicação tem sido demonstrada sob doses baixas de resveratrol (Li, Cao, & Zhu, 2006). *In vivo*, o resveratrol mostrou aumentar a capacidade antioxidante do plasma e diminuir a peroxidação lipídica (Wenzel *et al.*, 2005; Whitehead, Robinson *et al.*, 1995), que está fortemente associada com o risco de doença cardíaca coronária e enfarte do miocárdio (Holvoet, 2004). Estudos em ratos, porcos e seres humanos parecem indicar que o resveratrol pode suprimir aumentos patológicos na peroxidação dos lípidos e outras macromoléculas, *in vivo*, mas se o mecanismo é direto, indireto ou ambos, ainda não está claro (Baur *et al.*, 2006).

Como antioxidante, o resveratrol pode retardar e/ou impedir a doença ou dano celular induzido pelo *stress* oxidativo. O dano excessivo causado pelo *stress* oxidativo pode induzir as células a sofrer apoptose. Vários estudos mostram que o resveratrol inibe a apoptose em várias linhas celulares (King *et al.*, 2006).

Nos últimos anos tem havido um interesse considerável em antioxidantes. A extensa pesquisa nesta área levou a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos e das áreas de aplicação em produtos alimentares e não alimentares, bem como em sistemas biológicos e suplementos alimentares.

O uso de antioxidantes fenólicos para proteger os produtos alimentares da oxidação assim como melhorar o tempo de armazenamento dos produtos que contêm lípidos tem relevância nutricional e económica (Figueroa-Espinoza e Villeneuve, 2005; Mbatia *et al.*, 2011).

A oxidação lipídica, que é o principal evento na oxidação dos sistemas biológicos, é hoje um problema na indústria alimentar. Os antioxidantes são muitas vezes adicionados aos produtos alimentares para prevenir as reações de oxidação em cadeia, eles atuam inibindo a iniciação e a propagação e conseqüentemente retardam o processo oxidativo (Medina *et al.*, 2010).

Novos antioxidantes capazes de retardar a oxidação são desejáveis, ainda mais se estes antioxidantes possuírem propriedades biológicas relevantes.

A modificação de antioxidantes naturais para aumentar a sua estabilidade química, oxidativa e térmica, biodisponibilidade e/ou eficácia farmacêutica fornece uma série de antioxidantes semissintéticos com grande impacto na indústria (Torres *et al.*, 2010).

1.4. Outras atividades biológicas dos flavonóides e do resveratrol

Os flavonóides têm muitos efeitos benéficos para a saúde. A área mais ativa da pesquisa dos flavonóides está relacionada com a sua possível contribuição para a prevenção e tratamento de diversas patologias (Harborne e Williams, 2000).

O efeito protetor dos flavonóides é atribuído principalmente à sua atividade antioxidante e sequestro de radicais livres (Lin e Weng, 2006; Rice Evans *et al.*, 1996), no entanto os flavonóides possuem outras propriedades que são benéficas para a saúde humana tais como, atividade antimicrobiana (Proestos *et al.*, 2006; Martini *et al.*, 2004), antiviral (Shimura *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998), anticarcinogénica (Linsalata and Russo, 2008; Brownson *et al.*, 2002; Depeint *et al.*, 2002; Middleton *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998), anti-inflamatória (Narayana *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998), antialérgica (Yamamura *et al.*, 1998), vasodilatadora (Zenebe and Pechanova, 2002) e de inibição de diversas enzimas (Vasquez-Martinez *et al.*, 2007; Dangles e Dufour, 2006; Middleton *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 1990).

Os flavonóides podem atuar nas diferentes fases de desenvolvimento dos tumores malignos porque protegem o ADN contra o dano oxidativo, inativando a carcinogénese, inibindo a manifestação dos genes mutagénicos e as enzimas responsáveis pela ativação das substâncias pró carcinogénicas, e ativando os sistemas responsáveis pela desintoxicação xenobiótica (Bravo, 1998). Nos últimos anos, os estudos das atividades dos flavonóides foram muito associados com a inibição de enzimas e a atividade proliferativa. Muitos desses estudos mostraram uma relação estrutura-função, demonstrando que as atividades antioxidante, antiproliferativa e inibitória de enzimas são

dependentes de determinadas características estruturais (Kawai *et al.*, 1999; Casagrande e Darbon, 2001; Manthey e Guthrie, 2002; Bagli *et al.*, 2004; Mayr *et al.*, 2005).

Muitos estudos epidemiológicos mostraram que o consumo regular de flavonóides está associado com a redução do risco de doenças cardiovasculares (Middleton *et al.*, 2000). Na doença coronária, os efeitos protetores dos flavonóides incluem principalmente atividade antitrombótica, antiisquêmica, antioxidante e vasorelaxante (Jendekova e Kojsova, 2006). Foi sugerido que os flavonóides diminuem o risco de doença coronária por três ações principais: (A) melhoram a vasodilatação coronária, (B) diminuem a capacidade das plaquetas coagularem, e (C) previnem as LDL de oxidarem (Benavente-García e J. Castillo, 2008).

Um crescente número de estudos demonstrou a eficácia dos antioxidantes polifenólicos das frutas e dos vegetais em reduzir ou bloquear a morte dos neurónios que ocorre na fisiopatologia das doenças de Alzheimer e de Parkinson (Ramassamy, 2006). O consumo de flavonóides também foi associado com o menor risco de doença de Alzheimer em fumadores (Engelhart *et al.*, 2002). Num estudo epidemiológico realizado em 1367 pessoas com mais de 65 anos e com um consumo de flavonóides controlado durante 5 anos, concluiu-se que o consumo de flavonóides estava inversamente relacionado com o risco de ocorrência de demência (Commenges *et al.*, 2000). Esta conclusão foi confirmada num estudo posterior com 1640 indivíduos sem demência com mais de 65 anos e com alimentação controlada durante 10 anos. Além disso, foi concluído que quanto maior o consumo de flavonóides melhor é a evolução cognitiva (Letenneu *et al.*, 2007).

Um número significativo de estudos mostrou os efeitos protetores de vários flavonóides contra o dano cerebral depois de uma isquemia cerebral (Gutierrez-Merino *et al.*, 2011).

Os flavonóides de várias classes são inibidores da monoamina oxidase A ou B, funcionando assim como antidepressivos ou melhorando as condições dos pacientes de Parkinson. Os flavanóis, as flavanonas e as antocianinas previnem os processos inflamatórios que conduzem à lesão do nervo. Os estudos *in vivo* mostraram que os flavonóides podem ser absorvidos após administração oral, passam a barreira hematoencefálica e têm vários efeitos no SNC (Jager e Saaby, 2011).

Há evidências de que os flavonóides têm efeito na cognição, memória e neurodegeneração. Embora muitos dos estudos nesse campo tenham sido realizados com frutos ricos em flavonóides, quer estes estudos quer os estudos com flavonóides isolados indicam que os flavonóides têm o potencial de proteger os neurônios contra lesões induzidas por neurotoxinas e neuroinflamação, um potencial para ativar sinalização sináptica e uma capacidade para melhorar o fluxo de sangue cerebral, tal como foi recentemente revisto (Spencer, J. P. E., 2010; Jager e Saaby, 2011).

Jang *et al.* (1997) reportaram a capacidade do resveratrol inibir a carcinogênese nos três estágios (iniciação, promoção e progressão). A aplicação tópica de resveratrol reduz em mais de 80% o número de tumores por ratinho desencadeando um interesse muito grande da comunidade científica por esta molécula.

O resveratrol pode diminuir o desenvolvimento dos tumores através de múltiplos mecanismos complementares. Ele inibe a atividade enzimática de ambas as

ciclooxigenases, o que implica uma redução no risco de desenvolver muitos câncros. Outro mecanismo pelo qual o resveratrol pode combater a formação de tumores é a indução da paragem do ciclo celular e a apoptose. Os efeitos antiproliferativos e pro-apoptóticos do resveratrol em linhas celulares tumorais *in vivo* têm sido muito documentados (Aggarwal *et al.*, 2004). Estas observações são suportadas pela regulação das proteínas do ciclo celular (Schneider *et al.*, 2001) e o aumento da apoptose (Garvin, Ollinger, & Dabrosin, 2006) em modelos tumorais *in vivo*.

A eficácia do resveratrol no cancro do colon foi extensivamente estudada. Num estudo, o tratamento das células CaCo-2 com 25µM de resveratrol causou uma inibição de 70% no crescimento do tumor. A administração oral de doses elevadas de resveratrol em água diminui a incidência de tumores em ratinhos (Athar *et al.*, 2007).

Outros estudos em ratinhos, mostram que os suplementos de resveratrol atrasam o desenvolvimento do tumor mamário e reduzem as metástases (Provincialli *et al.*, 2005).

Num estudo populacional conduzido em Itália, foi observada uma relação inversa entre resveratrol consumido nas uvas e o cancro da mama, mas não do resveratrol ingerido no vinho (La Vecchia & Bosetti, 2006).

Estudos mostram que um copo de vinho tinto por dia pode reduzir em 50% o risco de cancro da próstata, e que o efeito protetor parece ser mais forte contra as formas mais agressivas da doença. Também se verificou que os homens que consomem 4 ou mais copos de vinho tinto por semana têm uma incidência 60% menor dos tipos mais agressivos do cancro da próstata (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/red-wine-and-cancer-prevention>).

Até ao presente, não existem evidências ou provas clínicas convincentes de que o resveratrol possa ser usado numa tentativa de curar o cancro. Estão a ser conduzidos ensaios clínicos em fase I em pessoas saudáveis, primeiro para determinar a concentração de resveratrol e dos seus metabolitos no plasma, na urina e nas fezes dos participantes; segundo, para correlacionar a dose com a concentração sistémica deste composto e dos seus metabolitos nos participantes; e terceiro, para determinar a segurança deste composto (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/CCUM-2004-0535>).

O resveratrol protege o sistema cardiovascular de uma forma multidimensional (Hao & He, 2004). O ponto mais importante é que o resveratrol, quando em concentrações muito baixas, inibe a morte celular por apoptose, proporcionando assim proteção contra várias doenças incluindo lesão isquémica do miocárdio, aterosclerose e arritmias ventriculares.

O resveratrol modula o metabolismo dos lípidos e das lipoproteínas; e pode suprimir os aumentos patológicos da peroxidação em macromoléculas como os lípidos. Em 1982 mostrou-se que o resveratrol inibe a deposição do colesterol e dos triglicéridos no fígado de ratos, e diminui a velocidade de síntese de triglicéridos hepáticos (Arichi *et al.*, 1982). Mais tarde, foi demonstrado que o resveratrol inibe a peroxidação das lipoproteínas de baixa densidade *in vivo* mais do que um extrato de vinho tinto (Frankel *et al.*, 1993). O resveratrol foi detetado nas lipoproteínas de baixa densidade de humanos após o consumo de vinho tinto (Urpi-Sarda *et al.*, 2005).

A agregação das plaquetas é uma das principais contribuições para o processo de aterosclerose. O resveratrol impede a agregação das plaquetas *in vitro* (Bertelli *et al.*, 1995) e *in vivo* (Wang *et al.*, 2002). Outras pesquisas mostraram que o resveratrol reduz a

formação de placas ateroscleróticas e restaura a dilatação em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (Wang *et al.*, 2005).

O resveratrol também promove vasodilatação através de vários mecanismos, principalmente através da estimulação dos canais de K^+ dependentes do Ca^{2+} e o aumento de óxido nítrico no endotélio, e, portanto, pode exercer atividade vaso-relaxante (Li *et al.*, 2000; Orallo *et al.*, 2002). Em porquinhos-da-Índia, a administração de resveratrol diluído em água durante 16 dias (~14 mg por kg de peso corporal) aumentou significativamente a sua capacidade para eliminar os compostos oxidantes no músculo cardíaco (Floreani *et al.*, 2003).

Dados da literatura indicam que o resveratrol pode desempenhar uma função na prevenção da diabetes e das suas complicações (Harikumar & Aggarwal, 2008). Uma experiência *in vivo* revelou que 50 mg/kg de resveratrol administrado a ratinhos saudáveis, diminui as concentrações de insulina no sangue em 30 minutos, sem alterações concomitantes na glicemia. Estas descobertas sugerem a ação do resveratrol na supressão de insulina em ratinhos (Szkudelski, 2008).

Estudos recentes sugerem que o resveratrol pode ter um potencial antidiabético. Apesar de até agora o estudo dos efeitos anti hiperglicémicos do resveratrol só terem sido realizados em animais, os resultados são muito promissores. Um estudo mostrou que a injeção de resveratrol em ratinhos diabéticos resultou numa diminuição significativa dos níveis de glucose no sangue. Um outro estudo mostrou que a injeção direta de resveratrol nos cérebros de ratinhos diabéticos resultou na redução dos níveis de insulina no sangue, um efeito antidiabético. Em animais com hiperinsulinemia, o resveratrol diminui a insulina no sangue. Além disso, muitos estudos indicam que em ratinhos diabéticos, o

resveratrol é capaz de diminuir a hiperglicemia. Apesar de os efeitos terem sido mostrados em animais, o potencial antidiabético do resveratrol merece investigação adicional e mais estudos para que o mesmo efeito possa ser demonstrado em humanos (Das, Das, 2010).

O resveratrol exerce efeitos terapêuticos em doenças cerebrais degenerativas como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a doença de Huntington e o derrame cerebral (Sun *et al.*, 2010).

Concretamente, o resveratrol é capaz de penetrar na barreira hematoencefálica e exercer fortes efeitos neuroprotetores, mesmo em doses baixas. O resveratrol combate a disfunção neurónica causada pelas doenças de Alzheimer e Huntington, através da sirtuina 1 (Parker *et al.*, 2005). A prevenção da doença de Parkinson é baseada no mecanismo de *scavenging* realizado pelo resveratrol (Karlsson *et al.*, 2000). A eficácia do resveratrol contra vários mecanismos foi recentemente confirmada, e o resveratrol mostrou ser potencialmente útil na proteção do dano cerebral resultante da isquemia cerebral (Dong *et al.*, 2008).

Adicionalmente, o resveratrol aumenta o tempo de vida da *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, assim como de espécies de peixes de curta duração através da ativação das vias da sirtuina (Howitz *et al.*, 2003; Valenzano *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2004). Mais recentemente, Baur *et al.* (2006) mostraram que o resveratrol altera a fisiologia de ratinhos de meia-idade com alimentação calórica e aumenta a sua sobrevivência. Especificamente, os estudos em ratinhos mostraram que os animais obesos cuja alimentação foi suplementada com resveratrol não só vivem mais

tempo, mas também são mais ativos; tendo-se observado ainda uma redução dos níveis de insulina, um aumento do número de mitocôndrias e uma melhoria da função motora.

Um estudo recente destaca o papel do resveratrol na osteoartrite devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti apoptose. Foi demonstrado que o resveratrol tem a capacidade de inibir a apoptose induzida pelos condrócitos. Estudos *in vivo* também mostraram que o resveratrol protege contra as alterações associadas com a osteoartrite (Shen *et al.*, 2012).

Dois estudos *in vivo* examinaram os efeitos do resveratrol administrado através de injeções intra-articulares na osteoartrite. No primeiro estudo, Elmali *et al.* (2005) relataram que 2 semanas de suplemento de resveratrol resultaram numa redução significativa da destruição da cartilagem e na perda de proteoglicanas em coelhos. Mais recentemente, Wang *et al.* (2011) investigaram os efeitos de 2 semanas de injeções de resveratrol sobre as alterações histológicas no interior da cartilagem, na apoptose de condrócitos e na produção de óxido nítrico no fluido sinovial. Estes autores também relataram a destruição da cartilagem e a diminuição das proteoglicanas. Estes efeitos protetores do resveratrol resultaram numa diminuição da artrite induzida por apoptose de condrócitos e da quantidade de óxido nítrico sinovial. É importante notar que a eficácia do resveratrol nestes estudos foi observada com exposição direta de resveratrol para a articulação e não com suplemento dietético. Não está claro se os mesmos benefícios seriam fornecidos através de suplemento oral.

1.5. Modificações sintéticas de compostos polifenólicos para aumentarem a atividade biológica

A modificação das estruturas dos compostos polifenólicos, nomeadamente de flavonoides e estilbenos, pode permitir a descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas melhoradas.

A acilação enzimática regiosselectiva da naringina e da rutina (figura 8) foi realizada com diferentes ácidos gordos mono e poli-insaturados usando lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym 435) em acetona a 50°C. Os rendimentos de conversão da naringina e da rutina foram 85 e 70 %, respetivamente, usando ácido oleico como dador de acilo (Mellou *et al.*, 2006).

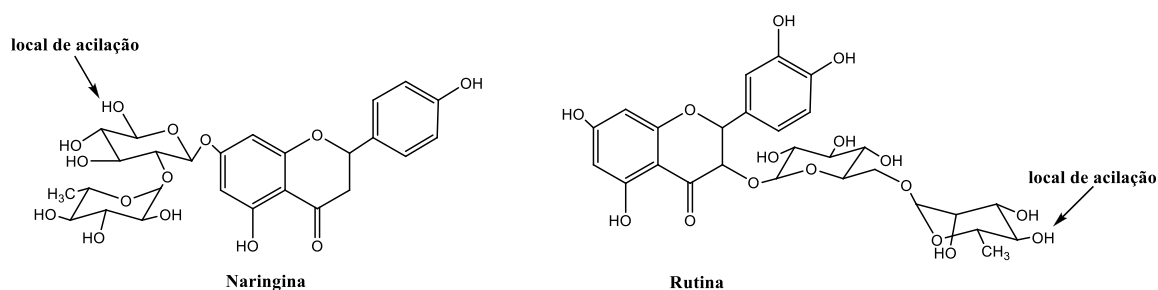


Figura 8. Acilação enzimática regiosselectiva da naringina e da rutina (Mellou *et al.*, 2006)

Verificou-se que os ésteres de ácidos gordos poli-insaturados obtidos são normalmente moléculas altamente oxidáveis (e portanto, bons antioxidantes) com a vantagem de apresentarem melhores características de solubilidade que os compostos de partida. Este trabalho também forneceu a primeira evidência de que, embora as moléculas iniciais rutina e ácidos gordos sejam inativas, os seus ésteres são capazes de diminuir a

produção de fator de crescimento vascular endotelial pelas células de leucemia humanas K562, o que indica que os novos compostos podem possuir propriedades anti-tumorais e antiogénicas (Mellou *et al.*, 2006).

Os derivados acilados do flavonóide monossacarídeo crisoeriol-7-*O*- β -D- (3''-E-p-cumaroílo) -glucopiranósido assim como os do flavonóide dissacarídeo crisoeriol-7-[6''-O-acetil- β -D-alosilo-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranósido], foram sintetizados em solventes orgânicos usando CALB imobilizada. A avaliação biológica dos derivados obtidos mostrou que a introdução de um grupo laurato nos flavonóides glicosilados (P1 e P2) aumenta significativamente a sua atividade antioxidante *in vitro* (Mellou *et al.*, 2005) (figura 9).

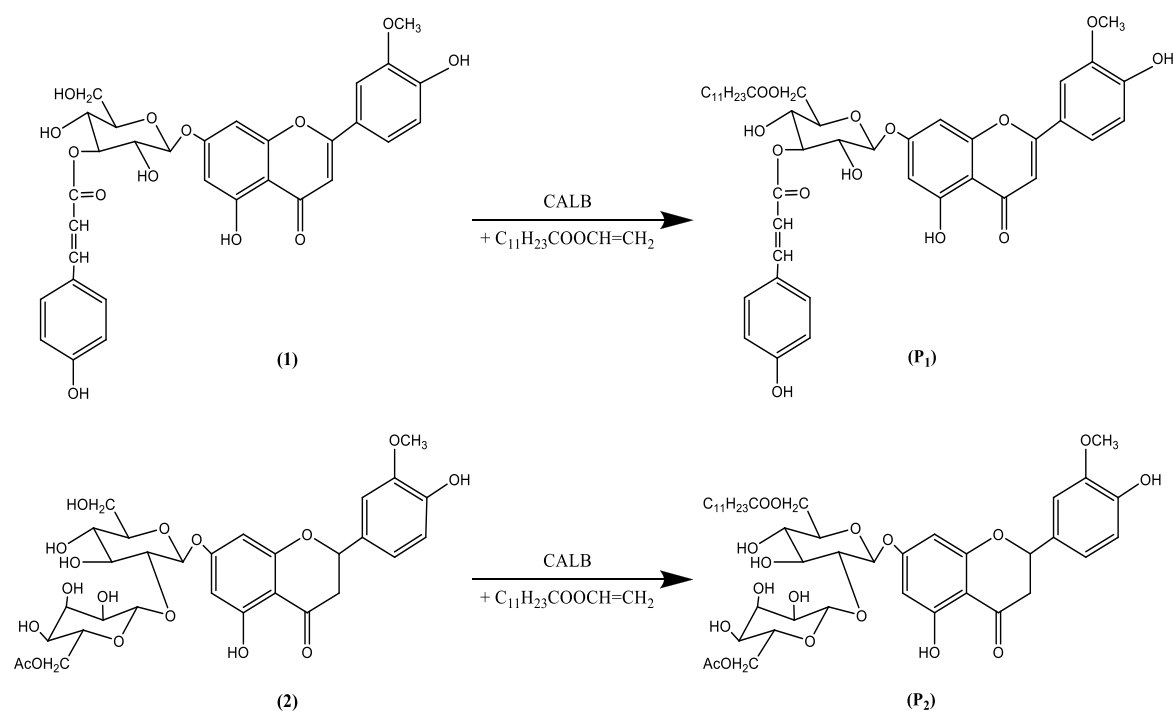


Figura 9. Esterificação enzimática crisoeriol-7-*O*- β -D- (3''-E-p-cumaroílo) (1), e crisoeriol-7- [6''-O-acetil- β -D-alosilo- (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranósido] (2) (Mellou *et al.*, 2005)

Katsoura *et al.* (2006) verificaram que a acilação biocatalítica da rutina com vários dadores de acilo afeta o seu potencial antioxidante para LDL isoladas. O aumento mais significativo foi no 4''-oleato de rutina.

A acilação de flavonóides é uma ferramenta útil na modificação das propriedades organoléticas dos alimentos. Apesar de os flavonóides possuírem vários benefícios para a saúde, os alimentos que os contêm sofrem muitas vezes de sabor amargo e adstringente. Degenhardt *et al.* (2007) verificaram que certos padrões de glicosilação e acilação podem modular os fatores negativos do sabor em preparações alimentares, farmacêuticas e cosméticas. Ghoul *et al.* (2006) introduziram um processo para a preparação seletiva de glicosil flavonóides acilados com melhoria da estabilidade e da solubilidade em várias preparações mantendo ou melhorando o seu efeito antioxidante.

Os ácidos gordos insaturados livres representam um potencial risco porque são altamente reativos e podem gerar radicais livres que causam danos indesejáveis nos alimentos. A síntese enzimática de ésteres de flavonóides com ácidos gordos insaturados constitui uma solução útil para a estabilização destes ácidos altamente oxidáveis (Viskupicova *et al.*, 2010; Mellou *et al.*, 2006).

Viskupicova *et al.* (2010), prepararam novos derivados lipofílicos de rutina via esterificação enzimática com diferentes ácidos gordos saturados e insaturados. Os resultados obtidos sugerem que a modificação seletiva da molécula de rutina mantém a atividade antioxidante do flavonóide inicial. Além disso, a derivatização lipofílica da rutina aumenta efetivamente a hidrofobicidade e solubilidade em gorduras, aumentando assim a eficiência dos ésteres preparados em meios lipofílicos. Os resultados indicam que

os derivados de rutina sintetizados podem ser úteis na proteção contra a oxidação durante o armazenamento e processamento dos alimentos ricos em matéria gorda.

Salem *et al.* (2011), verificaram que a acilação enzimática do 3-O-glucosídeo da iso-harmetina com etilaurato e etilbutirato aumenta a sua capacidade de inibir a xantina oxidase e a sua atividade antiproliferativa em relação às células CaCo₂ no entanto diminui a sua atividade para sequestrar radicais.

A preparação biocatalítica de ésteres alquilo de prunina, uma glucosil-flavona derivada da naringina, foi realizada em meio orgânico usando duas enzimas imobilizadas: a Novozym 435 e a Lipozime RM IM (figura 10). Os derivados modificados preservaram a atividade antiradicalar do composto inicial e a sua solubilidade aumentou significativamente no meio hidrofóbico 1-octanol (Céliz, Daz, 2011).

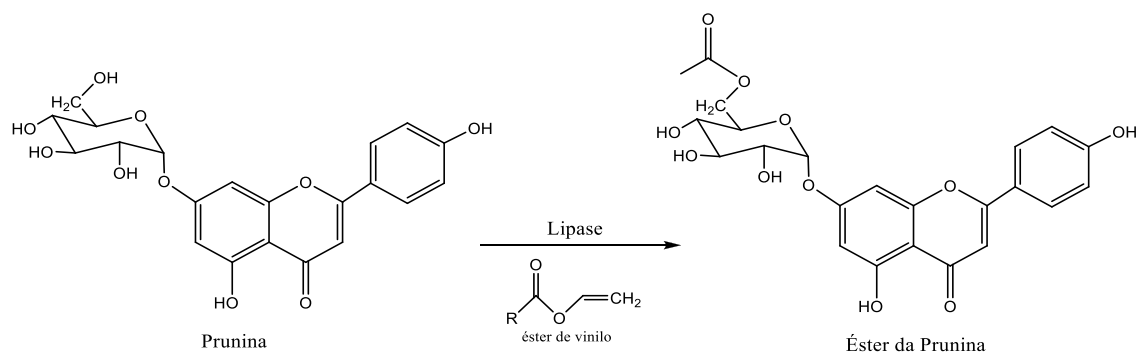


Figura 10. Síntese da 6''-O-acil prunina

Num estudo recente, foram sintetizados vários derivados de bergenina através da alcoólise regioselectiva do pentaacetato de bergenina e subsequente esterificação do grupo fenólico livre com ácidos carboxílicos. Os derivados sintetizados apresentam atividade de sequestro de radicais mais pronunciada que a bergenina e alguns deles

possuem atividade antimicrobiana contra a *Escherichia coli* para a qual a bergenina é inativa (Nazir *et al.*, 2011).

Novos derivados de silibina acilados com ácidos dicarboxílicos foram preparados em vários solventes orgânicos usando CALB (figura 11). Os efeitos antiproliferativos dos monoésteres de silibina, e a sua capacidade para modelar a secreção do fator de crescimento endotelial vascular foi estimada usando células humanas e comparadas com o composto inicial. Os ésteres sintetizados mantiveram a função biológica da silibina e, em alguns casos, foram mais eficazes, indicando que a biotransformação pode gerar compostos com atividades antitumorais e antiangiogênicas melhoradas (Theodosiou *et al.*, 2011).

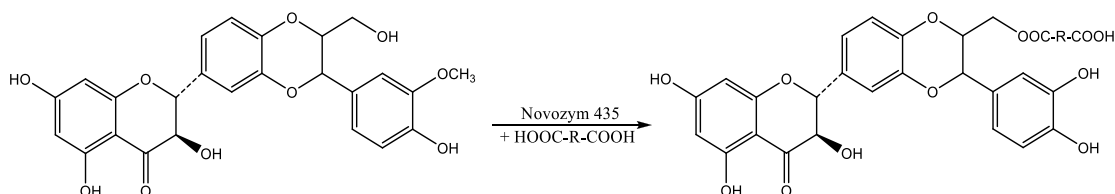


Figura 11. Acilação enzimática da silibina com ácidos dicarboxílicos (HOOC-R-COOH) catalisada pela Novozym 435 em solventes orgânicos

Szekeres *et al.* (2011), modificaram a molécula de resveratrol e sintetizaram um número de compostos com diferentes efeitos bioquímicos. Os derivados poli-metoxilados e poli-hidroxilados mostraram ser capazes de inibir o crescimento de células tumorais em várias linhas celulares e a inflamação (atividade das ciclooxigenases), em parte mais eficientemente que o próprio resveratrol. O composto *lead*, o hexahidroxiestilbeno, foi o mais eficiente na inibição do crescimento de células tumorais e na atividade da ciclooxigenase 2 e por isso foi estudado em ratinhos com melanomas. Com este estudo os

autores concluíram que os derivados hidroxilados análogos do resveratrol representam uma classe nova de compostos anticancerígenos e são candidatos promissores para estudos *in vivo*.

Ruan *et al.* (2011), sintetizaram e caracterizaram 23 derivados do resveratrol contendo uma porção chalcona. Os compostos sintetizados apresentaram, em geral, atividades antiproliferativas em relação às células HepG2, B16-F10 e A549 superiores ao resveratrol e exibiram uma potente atividade inibitória da polimerização da tubulina. No composto com maior atividade *in vitro*, foram realizados estudos de *docking* molecular que mostraram que o esqueleto resveratrol e o sistema carbonilo α - β instaurado da chalcona podem atuar sinergicamente no local de ligação colchicina-tubulina, levando à atividade antiproliferativa e de antipolimerização da tubulina.

Em 2012, Ruan *et al.*, continuando os seus estudos no resveratrol, sintetizaram 34 derivados do resveratrol possuindo uma porção cumarina e avaliaram a sua atividade antiproliferativa em relação às células HepG2, B16-F10 e A549 e inibição da polimerização da tubulina. Todos os compostos apresentaram valores de IC₅₀ melhores que o resveratrol. No composto com maior atividade *in vitro*, foram realizados estudos de *docking* molecular para determinar o modo de ligação colchicina-tubulina.

Recentemente, Lu *et al.* (2012) sintetizaram uma série de derivados do resveratrol que exibem potentes atividade antioxidante e de inibição da agregação da β -amiloide. Dos compostos sintetizados, 4 apresentaram valores de toxicidade inferiores ao resveratrol e o composto que deu melhores resultados é um potencial agente para o tratamento da doença de Alzheimer. Estudos de *druggability* deste composto estão a ser realizados pelos autores.

2. Biocatálise

2.1. Biocatálise

As enzimas são proteínas com funções catalíticas indispensáveis à manutenção da vida. Na Natureza, as enzimas promovem a interconversão de um vasto número de espécies químicas, gerando o material e a energia necessários à sobrevivência e ao crescimento das células. Assim, as enzimas atuam como catalisadores altamente seletivos, de tal forma que conseguem catalisar reações específicas em substratos específicos.

Nos últimos anos, a biocatálise, que se pode definir como a utilização de catalisadores biológicos, células ou enzimas isoladas, para promover a transformação de moléculas, tem encontrado um campo de aplicação cada vez mais vasto. De facto, as enzimas ocupam já uma posição única em química orgânica sintética por serem catalisadores seletivos e eficientes sob condições reacionais suaves (Bommarius e Riebel 2004a; Hari e Krishna, 2002).

A biocatálise é uma área científica interdisciplinar, que resulta da intersecção da química, da biologia e da engenharia, com grande aplicação em síntese na indústria química, farmacêutica e agroquímica, na biorremediação e na medicina, ao nível de análise e diagnóstico (Bommarius e Riebel, 2004a).

A cada vez maior disponibilidade de enzimas, devido a tecnologias que permitem a produção de novas enzimas em grandes quantidades e, por outro lado, a percepção de que muitas enzimas são capazes de transformar um largo espectro de substratos não naturais

levaram a um crescente interesse dos químicos orgânicos pela utilização de enzimas como catalisadores de reações (García-Junceda *et al.*, 2004).

A Biocatálise é uma das tecnologias mais verde para a síntese de moléculas bioativas onde a presença de vários grupos funcionais requer processos seletivos de proteção/desproteção. As técnicas eficazes para proteger grupos muitas vezes resultam em passos químicos adicionais. Neste ponto as enzimas podem ser muito valiosas porque ajudam a evitar passos reacionais diversos, devido a seletividade que mostram para um determinado grupo (Barbayianni; Kokofos, 2012).

2.2. Classes de enzimas

As enzimas são classificadas pela Enzyme Commission of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) em seis grupos principais de acordo com tipo de reação que catalisam. Cada classe principal é dividida em subclasses e subgrupos. As enzimas são classificadas individualmente com base na reação que catalisam, na natureza do substrato, no tipo de grupo funcional transferido ou na natureza da ligação envolvida (Bommarius e Riebel 2004a; Hari e Krishna, 2002, Boyce e Trpton, 2001).

As **oxido-redutases** catalisam reações de oxidação-redução, transferindo hidrogénio, oxigénio e/ou eletrões entre moléculas. A esta classe pertencem as desidrogenases (enzimas que catalisam a transferência de hidrogénio), as oxigenases (enzimas que catalisam a transferência de oxigénio a partir do oxigénio molecular), as oxidases (enzimas que catalisam a transferência de oxigénio molecular) e as peroxidases (enzimas que catalisam a transferência de eletrões para peróxidos).

Todas as oxido-redutases são dependentes de cofator, os quais fornecem ou aceitam os equivalentes de oxidação ou redução. Os cofatores mais comuns são NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, FADH/FAD⁺, ATP/ADP e PQQ. Uma vez que a maioria dos cofatores tem um custo elevado, para usar estas enzimas num processo industrial é necessário um sistema eficiente de regeneração do cofator. O uso de uma segunda enzima que necessite do mesmo cofator ou a adição de um segundo substrato são estratégias eficientes.

As **transferases** catalisam reações de transferência de um grupo químico, fosforílo, amino, acilo, glicosílo, de um composto (dador) para outro (aceitador).

Apesar de apresentarem elevada regio e estereosseletividade não são muito usadas na indústria porque ocorrem reações paralelas, os rendimentos são baixos e os grupos transferidos para os substratos são muito caros ou os seus produtos não são facilmente recicláveis.

As **hidrolases** catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C, P-O entre outras. Assim, as esterases catalisam as hidrólises de ésteres, as proteases catalisam a hidrólise de peptídeos e as lipases catalisam a hidrólise de acil gliceróis. Uma grande parte das enzimas comercialmente disponíveis pertence a esta classe. Posteriormente esta classe de enzimas será discutida em maior detalhe, especialmente as lipases.

As **isomerases** representam um pequeno número de enzimas que catalisam alterações estruturais e geométricas dentro da mesma molécula e tornam possível usar substratos baratos para obter produtos de elevado valor. Dependendo do tipo de isomerismo temos as epimerases, cis-trans isomerases, tautomerases e mutases. A enzima mais famosa deste grupo é a glucose isomerase, usada industrialmente na produção de frutose.

As **ligases** catalisam a formação de ligações C-O, C-S, C-N e C-C entre duas moléculas, sempre acompanhada de hidrólise de uma ligação pirofosfato no ATP ou num trifosfato semelhante. Estas enzimas não são usadas em biocatálise.

2.2.1. Hidrolases:Lipases

As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C, P-O entre outras. As hidrolases são as enzimas mais comuns em processos industriais (Hari Krishna, 2002).

As hidrolases não requerem cofatores, estão facilmente disponíveis, são versáteis e estáveis, aceitam uma grande variedade de substratos não naturais e exibem elevada quimio, regio e enantioselectividade (Carrea e Riva, 2000).

As lipases encontram-se entre os biocatalisadores mais importantes da indústria. Entre elas, são as lipases microbianas que têm o maior uso. As lipases encontram uso numa variedade de campos biotecnológicos tais como a indústria farmacêutica, alimentar, de detergentes e a agroquímica. As lipases podem ser classificadas em três grupos principais: lipases de mamíferos (lipase pancreática suína), lipases de fungos (*Candida rugosa* e família *Rhizomucor*) e lipases bacterianas (*Staphylococcus* e família *Pseudomonas*) (Hidalgo e Bornscheuer, 2006). Mais de 50% das lipases descritas são produzidas por levedura na forma de várias isoenzimas. As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem à classe das serina-hidrolases. Elas catalisam uma grande gama de reações, incluindo hidrólises, inter-esterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise. Sob condições naturais, catalisam a hidrólise de ligações éster na interface hidrofóbica-hidrofílica. Nesta interface, as lipases exibem um fenómeno denominado ativação interfacial, que provoca um extraordinário aumento na atividade

quando em contacto com uma superfície hidrofóbica. O processo catalítico envolve uma série de estados diferenciados: contacto com a interface, alteração conformacional, penetração na interface, e finalmente a própria catálise. Sob certas condições experimentais, tal como na ausência de água, são capazes de inverter a reação. A reação inversa conduz à esterificação e formação de glicérides de ácidos gordos e glicerol. Esta atividade sintética das lipases está a ser usada com sucesso na produção de ésteres de flavonóides (Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Hidalgo e Bornscheuer, 2006; Vakhlu e Kour, 2006).

2.3. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases

Embora as hidrolases evidenciem diferentes seletividades, a maioria são serina-hidrolases, sendo o mecanismo catalítico das serina-proteases (como a subtilisina) semelhante ao mecanismo catalítico das lipases. Apesar de a maioria das lipases necessitarem de ativação interfacial para expor o centro ativo, a arquitetura da tríade catalítica é semelhante. Esta tríade catalítica, constituída por serina, histidina e aspartato (ou glutamato), atua como um sistema de *charge relay* (Brady *et al.*, 1990; Cais e Theil, 2002; Bommarius e Riebel, 2004b).

Assim, no primeiro passo, o carboxilato do resíduo de ácido aspártico estabelece uma ponte de hidrogénio com a histidina e, por sua vez, o azoto da histidina liga-se ao álcool da serina também por uma ponte de hidrogénio. O oxianião da serina, resultante deste sistema de cedência de carga, ataca o carbono carbonílico do primeiro substrato, R_1COOR_2 , levando à formação do intermediário tetraédrico, à acil-enzima e à libertação do primeiro produto, R_2OH (figura 12).

No segundo passo, o grupo acilo é transferido para o nucleófilo, ou segundo substrato, R_3OH , para formar o segundo produto, R_1COOR_3 , regenerando a enzima livre. A estabilização dos intermediários oxianião por ligações de hidrogénio a grupos amina de outros aminoácidos (*oxyanion hole*) é crucial para a função catalítica da enzima (Brady *et al.*, 1990; Muralidhar *et al.*, 2002; Bommarius e Riebel, 2004b).

Durante ambos os passos, qualquer quiralidade presente no dador de acilo ou no nucleófilo pode ser reconhecida, determinando a estereo-selectividade da reação enzimática.

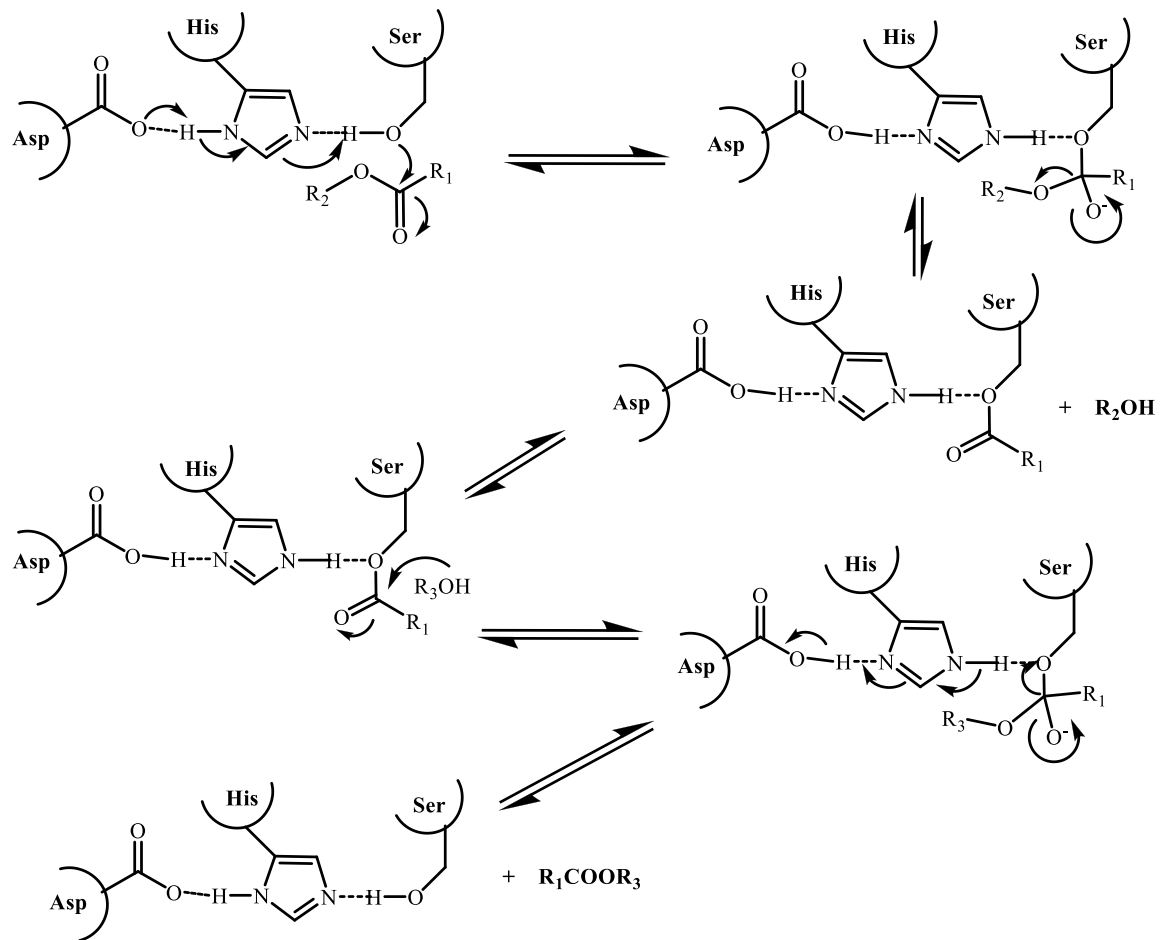


Figura 12. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases

2.4. Seletividade das enzimas

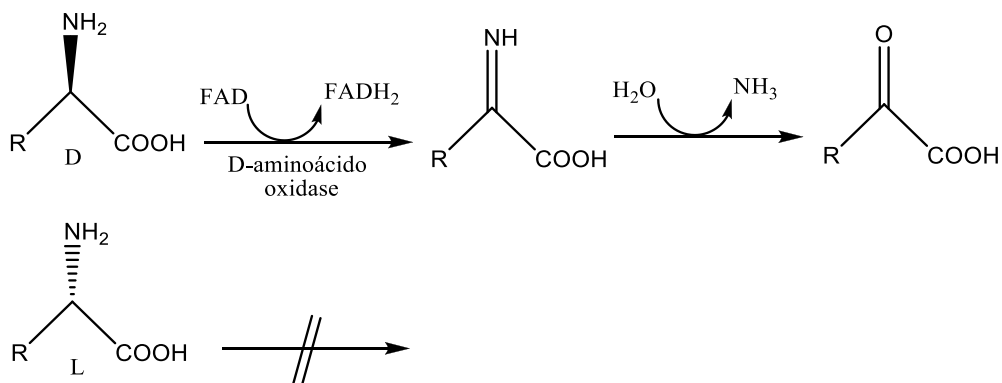
A grande procura pelas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de compostos isomericamente puros tem estimulado fortemente o desenvolvimento da biocatálise. De facto, as enzimas são extensamente reconhecidas como catalisadores valiosos em síntese orgânica devido à sua capacidade de se adaptarem a um grande número de substratos não naturais. A natureza quiral das enzimas torna-as capazes de catalisar sínteses estero- e regiosselectivas com extraordinária taxa de aceleração e, conseqüentemente, elas tem sido progressivamente exploradas para transformações assimétricas preparativas (Patel, 2006).

Além disso, o uso das enzimas como catalisadores mostrou ser muitas vezes a solução conveniente para certos problemas sintéticos. Deve notar-se também que as enzimas são catalisadores naturais ecologicamente vantajosos, uma vez que as suas fontes são renováveis e elas são biodegradáveis. Em muitos casos são baratas e reutilizáveis.

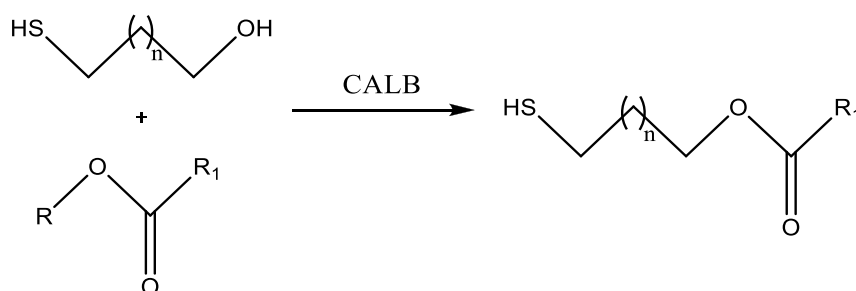
Uma importante característica das enzimas é a seletividade, ou seja a sua capacidade de distinguir entre dois substratos diferentes. O valor da seletividade, entre dois substratos A e B, é expresso pela razão das constantes de especificidade dos dois substratos $(K_{cat}/K_M)_A / (K_{cat}/K_M)_B$. A seletividade para o substrato pode ser de três tipos:

- Estereo-selectividade: as enzimas mostram seletividade entre dois estereoisómeros de uma molécula de substrato quiral. Isto significa que um dos isómeros reage mais rapidamente que o outro. Um bom exemplo é a enzima D-aminoácido

oxidase que mostra uma elevada enantioselectividade para D-aminoácidos e não tem atividade para a oxidação de L-aminoácidos (Huh et al., 1992).



- Quimioselectividade: as enzimas distinguem entre substratos com grupos químicos diferentes. Por exemplo a CALB mostra uma seletividade 10^5 vezes maior para álcoois do que para tióis em reações de transacilação (Hedfors et al., 2010).



- Regioselectividade: as enzimas podem ser seletivas para um ou dois grupos semelhantes na mesma molécula de substrato.

A lipase B de *Candida antarctica* é uma das lipases mais usadas devido a aceitar um grande número de substratos, à sua boa atividade catalítica e ao seu elevado grau de regioselectividade (Mellou *et al.*, 2005, 2006; Ardhaoui *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c; Gayot *et al.*, 2003; Kontogianni *et al.*, 2003, 2001, Gao *et al.*, 2001).

Os compostos polifenólicos são substratos particularmente interessantes para ilustrar a regioselectividade das lipases.

A acilação enzimática de dois flavonóides contendo a mesma aglicona, a quercetina (1) e a isoquercetina (2) com acetato de vinilo e CALB ou PS, em acetona a 50°C (figura 13) foi estudada. Usou-se um grande excesso de acetato de vinilo, razão molar flavonóide /acetato de vinilo, 1: 40. Nestas condições, a PS foi a única lipase ativa na transesterificação da quercetina não glicosilada e catalisou a acetilação sucessiva nas posições 4', 3' e 7', obtendo-se uma mistura de 4'-acetato, 3',4'-diacetato e 7,3',4'-triacetato. A ausência de acilação no 3-OH e no 5-OH foi atribuída ao envolvimento destes grupos em ligações de hidrogénio intramoleculares com o oxigénio carbonílico.

Na reação com isoquercetina, a PS catalisou preferencialmente a acilação do grupo hidroxilo primário 6''-OH, produzindo uma mistura de 6''-acetato e 4',6''-diacetato. Por sua vez, a CALB catalisou apenas a acilação de grupos OH do açúcar da isoquercetina. Uma vez acilado o 6''-OH, o 3''-OH e o 2''-OH podem ser adicionalmente esterificados para produzir uma mistura 3'', 6''-diacetato e 2'',3'',6''-triacetato de isoquercitrina (Chebil *et al.*, 2007).

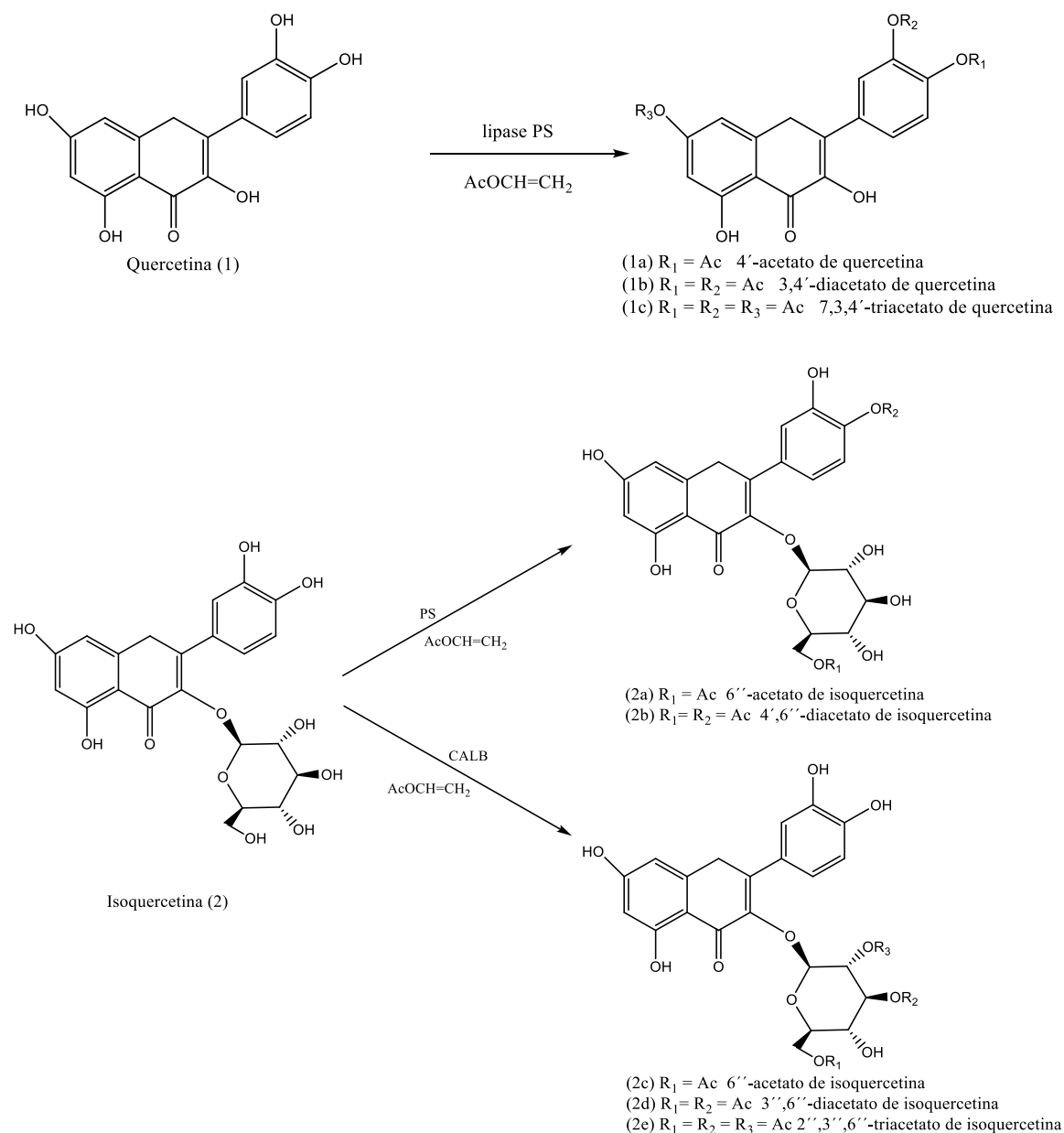


Figura 13. Acilação enzimática da quercetina (1) e da isoquercetina (2) catalisada pela PS e pela CALB em acetonitrilo, acetona e álcool *tert* amílico usando acetato de vinilo como dador de acilo (Chebil *et al.*, 2007)

Este estudo permite observar a elevada regiosselectividade destas enzimas, permitindo o isolamento de derivados acilados que seriam difíceis de obter por meios convencionais.

A esterificação enzimática da rutina e da naringina catalisada pela CALB usando alguns ácidos gordos – oleico, linoleico e γ -linoleico – como dadores de acilo (Mellou *et al.*, 2006), assim como a transesterificação da silibina com acetato de vinilo em acetona a 50°C (Gazak *et al.*, 2010) foram estudadas. Em todos os casos, as reações ocorreram com total regiosselectividade. A lipase direcionou a acilação na direção do único grupo hidroxilo primário presente na naringina e na silibina (figura 14). Além disso, a esterificação da rutina ocorreu exclusivamente na 4''-OH secundário da unidade rhamnose exterior.

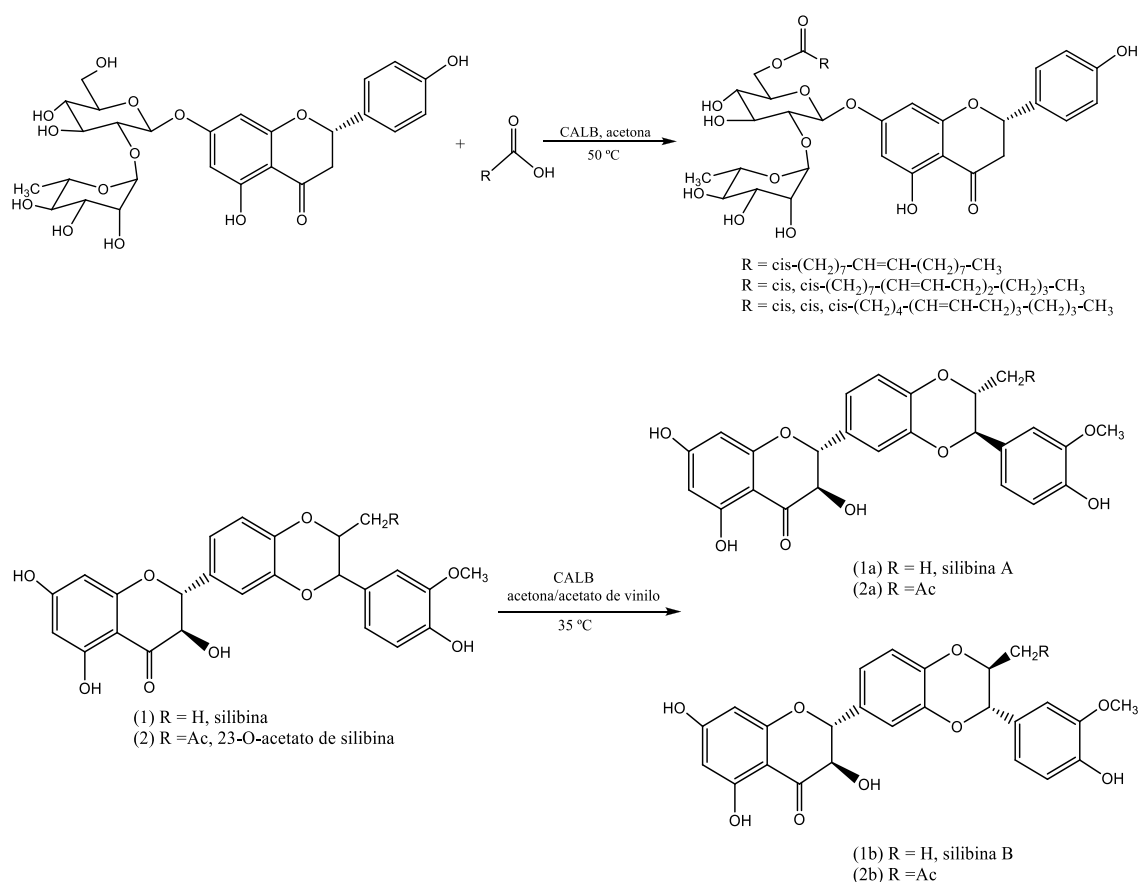


Figura 14. Acilação regiosselectiva da naringina e da silibina catalisada pela CALB: ^a foi usada uma mistura de silibina A e silibina B (Mellou *et al.*, 2006 e de Gazak *et al.*, 2010)

2.5. Biocatálise em meio orgânico

Os estudos pioneiros de Klibanov mostraram que as lipases têm atividade catalítica em meios orgânicos não naturais, apresentando elevada estabilidade e diferentes seletividades, dando oportunidade à grande aplicação destas enzimas, não apenas em reações de hidrólise de ésteres mas, a maioria delas, na reação inversa da síntese de ésteres mudando o nucleófilo da água para um álcool conveniente. Além disso, as enzimas são insolúveis em meios orgânicos, são facilmente removidas por filtração e no final do processo podem ser reutilizadas (Cruz Silva *et al.*, 2011).

Um dos inconvenientes mais sérios do uso das enzimas na síntese orgânica é a baixa solubilidade de alguns dos compostos orgânicos com mais de quatro átomos de carbono quando o processo é realizado na ausência de água. A água é um solvente pobre para praticamente todas as aplicações da química industrial uma vez que muitos compostos orgânicos são muitas vezes instáveis em solução aquosa. Além disso, a remoção de água é uma tarefa mais laboriosa e dispendiosa do que quando solventes orgânicos são usados devido ao menor ponto de ebulição destes. O uso de solventes orgânicos apresenta várias vantagens, tais como: (a) a fácil recuperação do substrato e do produto com elevado rendimento, (b) a possibilidade de usar substratos não polares, (c) o evitar de reações secundárias, (d) a alteração do equilíbrio termodinâmico que favorece a síntese e não a hidrólise (Carrea *et al.*, 2000).

A biocatálise em meio não aquoso foi muito usada na resolução de álcoois, ácidos ou lactonas através de reações de transesterificação enzimática usando lipases. Além disso, outros processos tal como a acilação enzimática de aminas ou amónia, mostraram ser de grande utilidade para a resolução de aminas e preparação de amidas quirais. O mecanismo destes processos é conhecido como mecanismo das serina-hidrolases, é comum para a síntese de ésteres, e também para processos enzimáticos de transesterificação, aminólise, amonólise, hidrazinólise e também perhidrólises de ésteres, nas quais o nucleófilo natural água é substituído por um álcool, amina, amónia, hidrazina ou hidroperóxido (figura 15) (Gotor-Fernández, 2006).

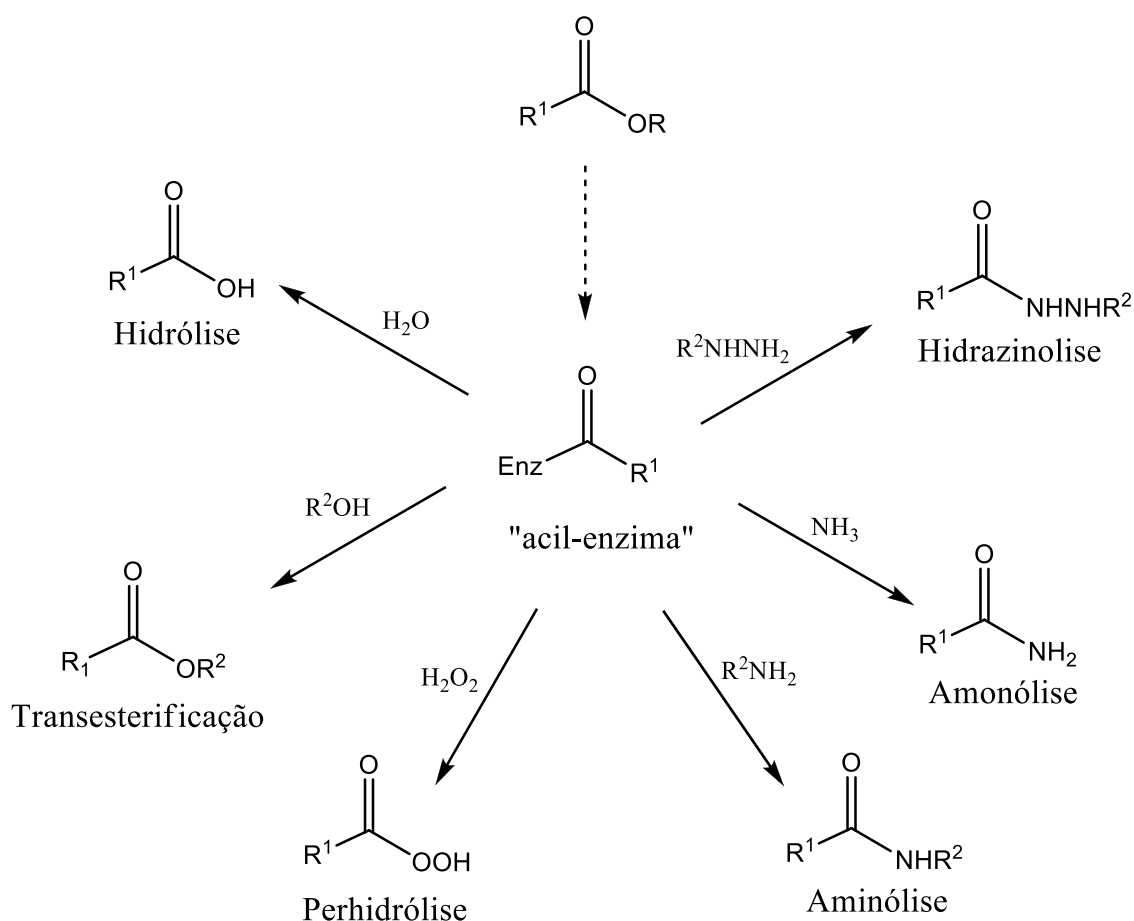


Figura 15. Biotransformações de um éster em solventes orgânicos (Gotor-Fernández, 2006)

Uma das primeiras transformações biocatalíticas foi a acilação enzimática regioselectiva. Uma vez que muitos produtos naturais são entidades poli-hidroxiladas, eles são compostos interessantes para transformações deste tipo. Têm sido descritos muitos exemplos de derivados acilados com atividades biológicas, estabilidade e biodisponibilidade melhoradas. Duas classes diferentes de enzimas – hidrolases e aciltransferases – têm sido as mais usadas para levar a cabo reações de acilação. Embora a função natural das hidrolases seja catalisar a hidrólise de uma variedade de substratos, a maioria delas, especialmente as lipases (triacilglicerol hidrolases), também podem operar em solventes orgânicos catalisando processos de esterificação, transesterificação e aminólise. Estas propriedades, juntamente com a sua ampla especificidade para substrato, disponibilidade e a não necessidade de cofactor, têm sido responsáveis pela aplicabilidade das hidrolases e são atrativas de um ponto de vista prático e económico.

Os avanços na biocatálise e biossíntese combinatória estimularam o interesse renovado na reação de acilação enzimática como uma ferramenta poderosa na otimização de potenciais fármacos de fontes naturais.

Atualmente a esterificação de flavonóides catalisada por enzimas em meio orgânico é uma técnica bem dominada para a síntese de flavonoides seletivamente modificados. Os resultados neste campo sugerem que um elevado grau de conversão para os esteres desejados pode ser alcançado quando são aplicadas as condições ótimas de reação. Os fatores chave, que influenciam a regioselectividade e o rendimento da acilação enzimática de flavonóides, incluem o tipo e a concentração da enzima, a estrutura e a concentração dos substratos (dador de acilo, aceitador de acilo e a sua razão),

a natureza do meio reacional, a quantidade de água no meio, a temperatura de reação e a natureza da reação como revisto em Chebil *et al.*, (2006 e 2007).

Foram investigadas duas reações para a acilação enzimática de flavonóides: esterificação direta e transesterificação (figura 16).

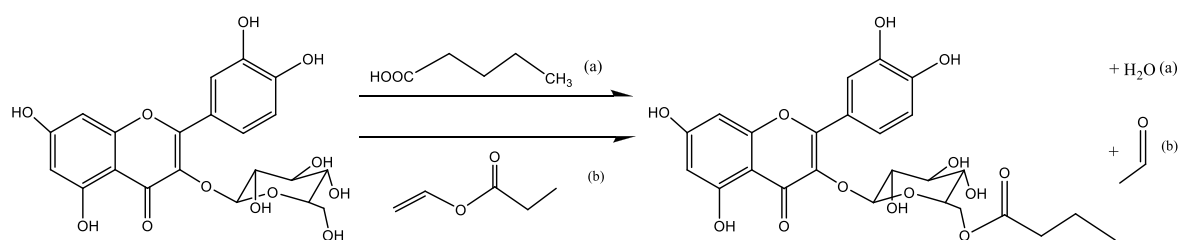


Figura 16. Acilação enzimática de glucosil- flavonóides na presença de um ácido carboxílico ou de um éster vinílico como dadores de acilo(a) esterificação, (b) transesterificação (Chebil *et al.*, 2006)

Em solventes orgânicos, as lipases também são capazes de catalisar a alcoólise, um processo de transesterificação reversível, onde um éster RCOOR' reage com um álcool $\text{R}''\text{OH}$ com formação de outro éster $\text{R}'\text{COOR}''$ e produção de álcool $\text{R}'\text{OH}$ (figura 17).

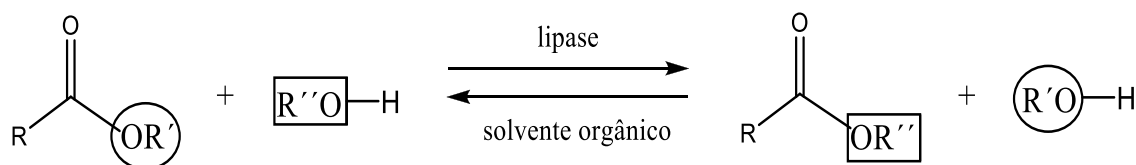


Figura 17. Alcoólise catalisada por lipase num solvente orgânico

O processo enzimático de alcoólise pode ser visto como um procedimento de desacilação. De facto a esterificação mostrada na figura 17 pode ser interpretada como uma reação que permite a libertação de um álcool $R'OH$ do éster correspondente $RCOOR'$ pela ação de outro álcool $R''OH$ que atua como nucleófilo. Esta reação pode ser vantajosamente usada em síntese orgânica uma vez que substratos não polares, tais como os ésteres, são solúveis em solventes orgânicos e nestes meios não convencionais as lipases ainda exibem atividade (Santaniello *et al.*, 2006).

CAPITULO 2

OBJETIVOS DA TESE

2. Objetivos da tese

A modificação seletiva de um grupo álcool num composto poli-hidroxiado é uma questão importante para os químicos orgânicos já que geralmente é muito demorada e requer passos de proteção e de desproteção que aumentam os custos e os subprodutos reduzindo os rendimentos finais. Neste sentido, as transformações biocatalíticas tomaram lugar na acilação regioselectiva de compostos polifuncionalizados maximizando a eficiência desses processos. Além disso, em muitos casos, os derivados acilados obtidos apresentam propriedades biológicas ou de disponibilidade superiores às dos substratos iniciais.

As lipases, devido à sua estabilidade, seletividade e atividade catalítica em condições suaves permitem a transformação de um grande número de compostos poli-hidroxiados.

O objetivo deste trabalho é a semi-síntese de novos derivados flavonóides bioactivos. Assim, procede-se ao estudo de reações de acilação e desacilação regioselectivas recorrendo a lipases como catalisadores.

Pretende-se obter novos derivados flavonóides através da modificação biocatalítica de flavonóides abundantes na Natureza. A estrutura do substrato flavonóide e do agente acilante, a enzima e o meio reacional são variáveis a ter em consideração.

Após isolamento dos novos derivados por coluna cromatográfica, a sua elucidação estrutural é feita por RMN unidimensional, concretamente, RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT 90 e 135.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e discussão

Os substratos usados, concretamente, crisina, resveratrol, naringenina e naringina são compostos polifenólicos com atividades biológicas relevantes. No entanto a sua aplicação comercial está limitada devido à baixa solubilidade em meios lipofílicos e à baixa disponibilidade no organismo. Sendo compostos poli-hidroxilados, a sua acilação por métodos químicos é um processo demorado com condições drásticas e com um baixo grau de regioselectividade. As lipases foram reconhecidas como agentes úteis devido à sua elevada regioselectividade e ao uso de condições de reação suaves.

3.1. Rastreo de solventes e enzimas

Neste trabalho foram testadas 3 enzimas. Concretamente a lipase de *Candida rugosa*, a lipase B de *Candida antarctica* immobilizada em resina acrílica (Novozym 435) e a lipase de *Pseudomonas cepacia*.

As performances das lipases comerciais foram avaliadas na esterificação dos substratos polifenólicos usando acetato de vinilo, butirato de vinilo e decanoato de vinilo como dadores de acilo e vários solventes.

O controlo por CCF permitiu a identificação, para cada substrato, da(s) lipase(s) capazes de promover a acilação de cada um dos substratos, concretamente resveratrol, naringenina, naringina e crisina. Todos os substratos foram aceites com exceção da crisina.

As performances das lipases foram avaliadas na alcoólise da naringenina e do resveratrol per-acilados na presença de butanol ou octanol e de vários solventes. O controlo por CCF permitiu a identificação, para cada substrato, da(s) lipase(s) capazes de promover a desacilação.

A escolha do solvente é um fator determinante para a ocorrência da reação. Para cada um dos substratos foi identificado o melhor solvente para a reação.

3.2. Acilações enzimáticas regioselectivas

Para cada substrato, foram selecionadas as melhores condições de reação, de acordo com a análise qualitativa por CCF, e efetuaram-se reações em maior escala, permitindo o isolamento do éster correspondente com bons rendimentos. A identificação dos produtos obtidos foi facilmente feita por análise de RMN ^1H , nomeadamente através do desvio químico dos sinais devidos ao próton ligado ao carbono ao qual se liga o hidroxilo acilado, análise RMN ^{13}C e DEPT 90 e 135. De salientar que os sinais na zona dos 2 ppm, dos 3 ppm e dos 8 ppm nos espectros RMN ^1H são relativos ao dimetilsulfóxido em clorofórmio deuterado, à água em dimetilsulfóxido deuterado e ao clorofórmio em dimetilsulfóxido deuterado respetivamente. Do mesmo modo, os sinais na zona dos 38 ppm e 77 ppm nos espectros RMN ^{13}C são relativos ao dimetilsulfóxido em clorofórmio deuterado e ao clorofórmio em dimetilsulfóxido deuterado.

3.2.1. Acilação enzimática da crisina

A crisina, ou 5,7-dihidroxi-flavona, está extensivamente distribuída nas plantas e foi descrita como tendo diversas atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória, antialérgica e ansiolítica.

Este substrato tem dois grupos hidroxilos em posição orto e para, estando o grupo hidroxilo em posição orto mais disponível para sofrer acilação.

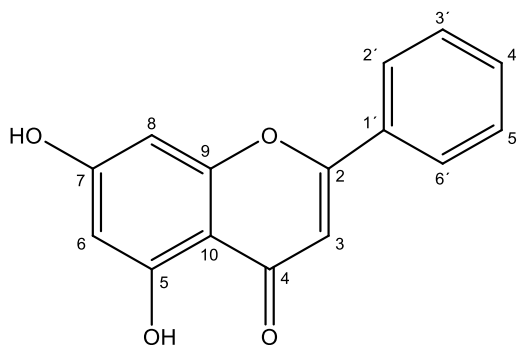


Figura 18. Estrutura da crisina

Para este substrato foi realizado um *screening* de enzimas e solventes usando acetato de vinilo como dador de acilo.

	Acetona	Acetonitrilo	Etilmetilcetona	Tolueno
CALB	-	-	-	-
PS	-	-	-	-

Tabela 1. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática da crisina usando acetato de vinilo como dador de acilo

Como ilustra a tabela a crisina não foi aceite como substrato por nenhuma das enzimas testadas.

É conhecido que o grupo 5-OH estabelece uma ligação de hidrogénio ao grupo carbonilo do anel B, não sendo de esperar que seja convertido em éster pela enzima. Porém, o grupo 7-OH estaria em condições de ser aceite como substrato nucleófilo pela acil enzima, o que estaria de acordo com outros estudos de acilação enzimática de flavonóides (Shin *et al.*, 1999).

3.2.2. Acilação enzimática da naringenina

A naringenina ou 4',5,7-trihidroxi-flavanona é um flavonóide encontrado nos sumos de toranja. Tem sido relatada por ter vários efeitos biológicos na saúde humana, tais como, atividade antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e potenciadora da memória.

Este substrato, é semelhante à crisina, tendo um grupo hidroxilo adicional no anel C e o carbono 2 é sp^3 ao contrário do mesmo carbono na crisina, que está ligado ao C-3 por uma dupla ligação. Assim, a naringenina é uma molécula mais polar e mais flexível. Possui três grupos hidroxilo. Os grupos hidroxilo nas posições 7 e 4' encontram-se mais desimpedidos do que o na posição 5, e são os mais suscetíveis de sofrer acilação.

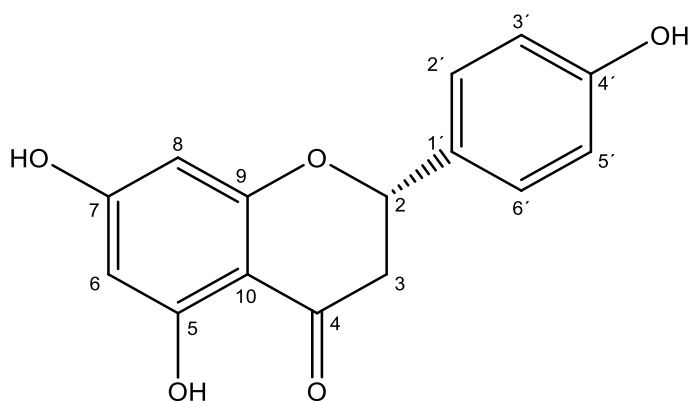


Figura 19. Estrutura da naringenina

Assim, iniciou-se o estudo deste substrato com um *screening* de enzimas e solventes usando acetato de vinilo como dador de acilo.

	Acetona	Acetonitrilo	THF	Etilmetilcetona	Acetato de Etilo
CALB	nd	-	-	-	-
PS	-	-	+	-	-

Tabela 2. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática da naringenina usando acetato de vinilo como dador de acilo

Observando a tabela anterior é possível concluir que a naringenina foi aceita como substrato pela lipase PS. O solvente é um fator determinante para a ocorrência de reação. De fato, apenas em THF a reação tem lugar.

De seguida, efetuou-se a reação em maior escala usando TFH como solvente na presença de lipase PS a 50°C e 200 rpm. A reação revelou-se muito lenta e não foi possível isolar qualquer produto.

A acilação enzimática da naringenina foi estudada por Chebil *et al.* (2007). O procedimento descrito foi reproduzido. Efetuou-se uma reação em maior escala usando acetonitrilo como solvente na presença de lipase PS a 50° C e 200 rpm. Todavia não se observou reação.

Mais recentemente, Kyriakou *et al.* (2012) descreveram a acilação enzimática da naringenina. Assim, seguindo o procedimento destes autores, efetuou-se uma reação em maior escala usando acetona como solvente na presença de uma quantidade muito elevada de CALB a 50°C e 200 rpm.

Isolou-se um único produto com rendimento de 53,2%.

Para confirmação estrutural do produto de reação, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, a naringenina, para efeitos de comparação.

O espectro de RMN ¹H da naringenina (figura 20) forneceu sinais característicos do núcleo flavonóide, como δ_H 11,94 ppm, atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo do carbono C-5, envolvido numa ligação de hidrogénio intramolecular com o carbonilo da posição C-4, δ_H 10,45 ppm, atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo do carbono C-7 e δ_H 9,30 ppm, referente ao hidroxilo presente em C-4'. Também se observaram dois

dubletos centrados a δ_H 7,11 ppm (2H, d, $J=8,57$ Hz, H-2' e H-6') e δ_H 6,62 ppm (2H, d, $J=8,72$ Hz, H-3' e H-5'), a região de deslocamento químico de hidrogénios aromáticos presentes no anel C. O singuleto a δ_H 5,71 ppm é referente aos hidrogénios da posição H-6 e H-8 do anel A. Os sinais observados a δ_H 5,23 ppm (1H, dd, $J=2,90$ Hz, H-2), δ_H 3,05 ppm (1H, m, H-3_{trans}) e δ_H 2,54 ppm (1H, m, H-3_{cis}) estão relacionados com anel B do núcleo flavanona.

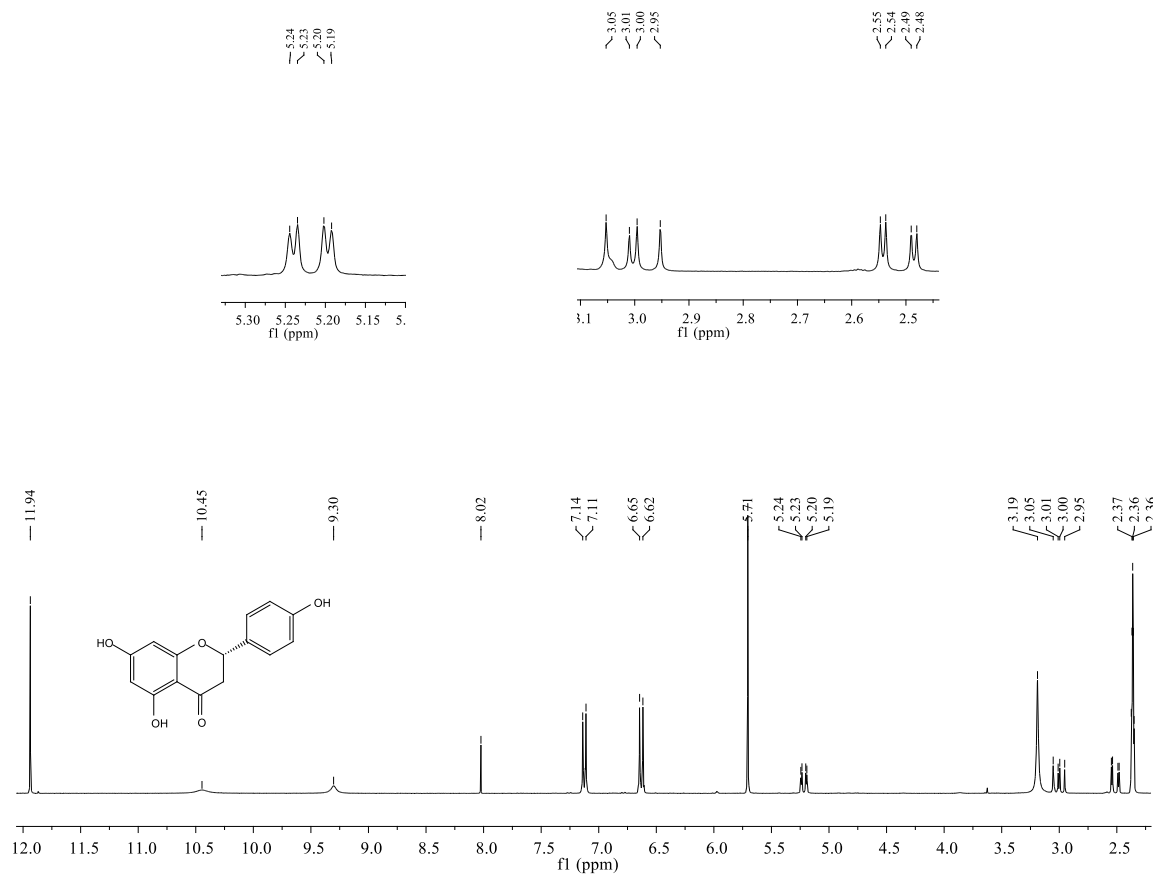


Figura 20. Espectro de RMN ^1H da naringenina

O espectro de RMN ^{13}C da naringenina (figura 21) forneceu os desvios dos 15 carbonos da estrutura da naringenina, 40,67 ppm (C-3); 77,10 ppm (C-2); 93,71 ppm (C-

8); 94,62 ppm (C-6); 100,56 ppm (C-10); 114,04 ppm (C-3'e C-5'); 126,96 ppm (C-2'e C-6'); 127,69 ppm (C-1'); 156,89 ppm (C-4'); 162,02 ppm (C-9); 162,67 ppm (C-5); 165,96 ppm (C-7) e 195,27 ppm (C-4).

A caracterização de cada carbono foi auxiliada pela análise do espectro DEPT 90/135 (figura 22). Assim, é possível concluir que dos 15 carbonos da naringenina, 7 são quaternários, 1 é CH₂ e 7 são CH.

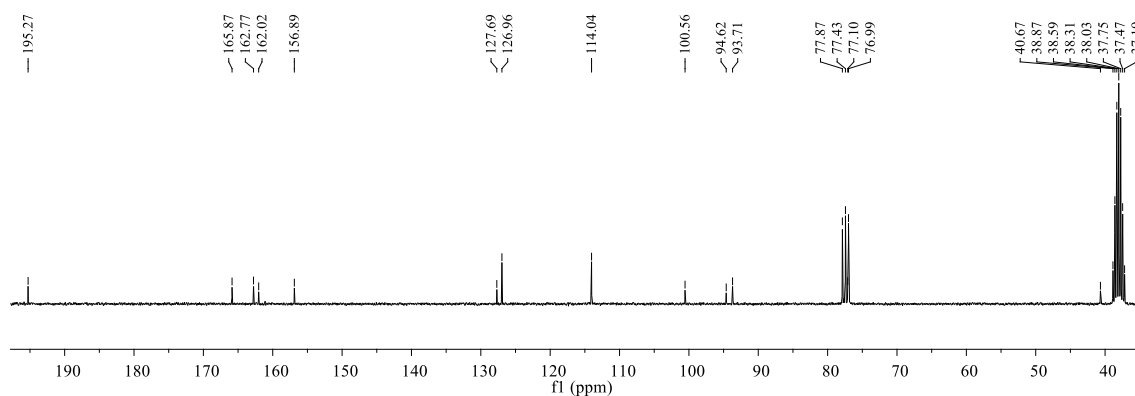


Figura 21. Espectro de RMN ¹³C da naringenina

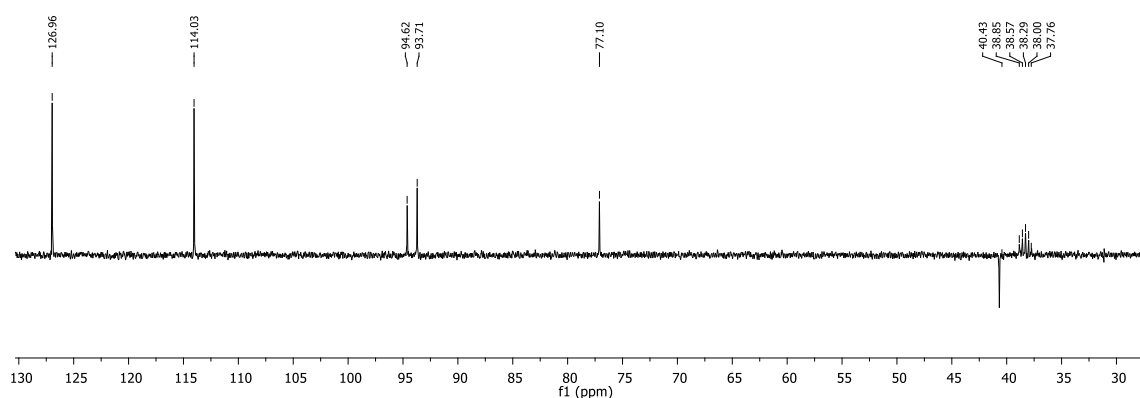


Figura 22. Espectro DEPT 90/135 da naringenina

Na análise do espectro de RMN ^1H do produto da reação de acilação enzimática da naringenina (figura 23), observou-se o desaparecimento do sinal a δ_{H} 9,30 ppm assim como o aparecimento do sinal característico do grupo metílico a δ_{H} 2,12 ppm.

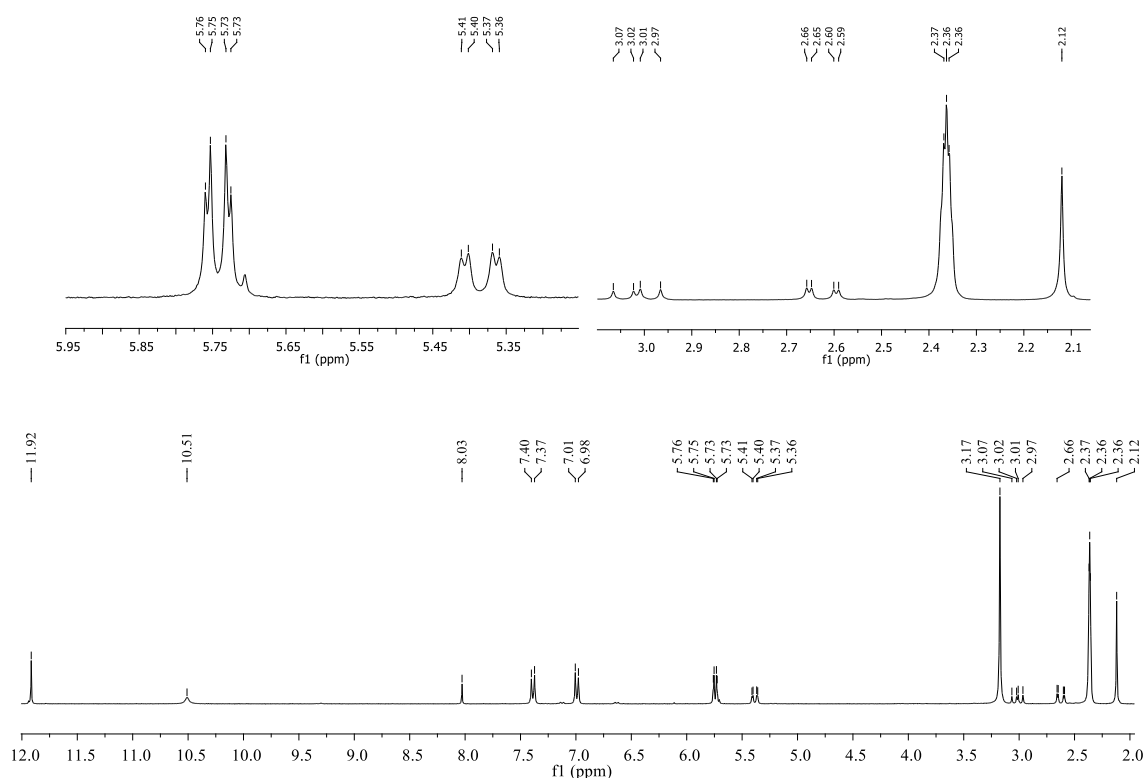


Figura 23. Espectro de RMN ^1H do produto da acilação enzimática da naringenina

Observando o espectro de RMN ^{13}C do produto de reação de acilação enzimática da naringenina (figura 24), verificou-se o aparecimento de dois sinais com desvios químicos de 19,11 ppm e de 168,05 ppm, referentes ao carbono metílico e carbonilo do grupo acetato. Além disso, verificou-se que os sinais atribuídos a C-1', a C-3', a C-4' e a C-5' sofreram alterações. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos deslocamentos das posições do C-2', C-6', C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9 e C-10.

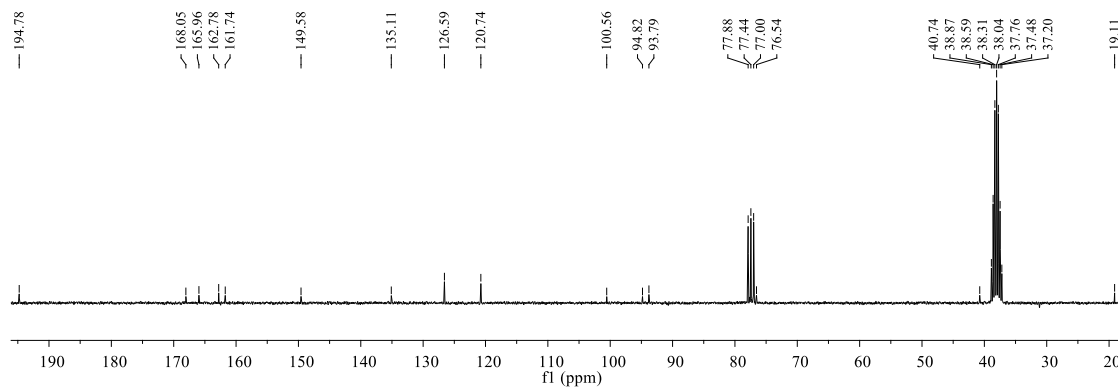


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática da naringenina

A análise dos espectros de DEPT 90 e 135 do produto de acilação enzimática da naringenina (figuras 25 e 26), permitiu concluir que o sinal a 194,78 ppm corresponde a um carbono quaternário e o sinal a 19,11 ppm a um grupo CH_3 que está ausente na naringenina.

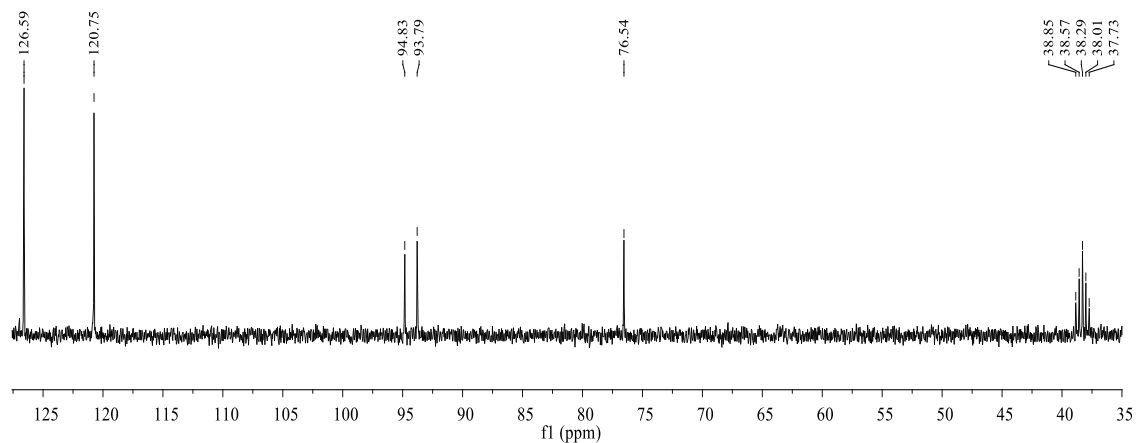


Figura 25. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática da naringenina

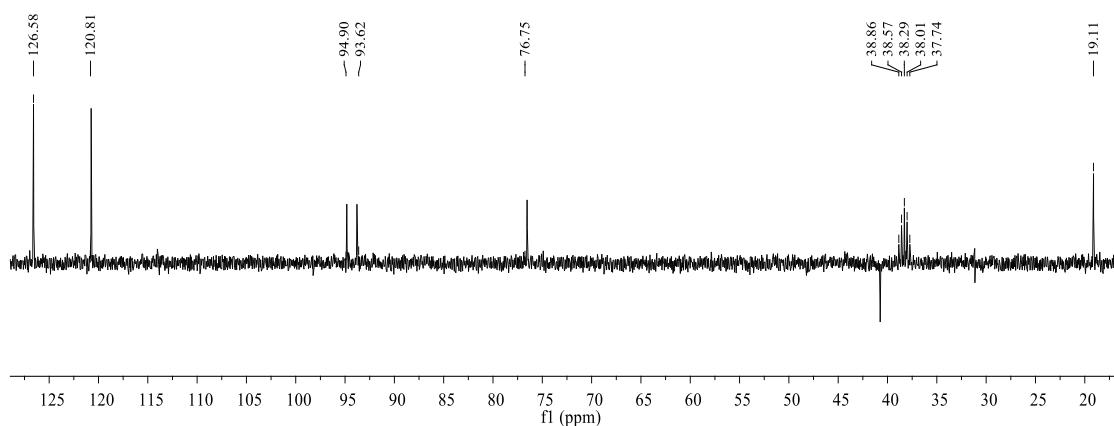


Figura 26. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática da naringenina

No espectro de IV do produto de acilação enzimática da naringenina (figura 27) foi possível observar uma banda a $838,883\text{ cm}^{-1}$ (banda12) referente às flexões das ligações C-H para fora do plano no anel aromático. Observou-se também, uma banda a $1224,58\text{ cm}^{-1}$ (banda 8) correspondente à elongação C-O dos álcoois e uma banda a $1629,55\text{ cm}^{-1}$ (banda 5) que corresponde à elongação C=C dos alcenos. Por fim, confirmando a formação do éster, observou-se uma banda C=O a $1752,98\text{ cm}^{-1}$ (banda 4).

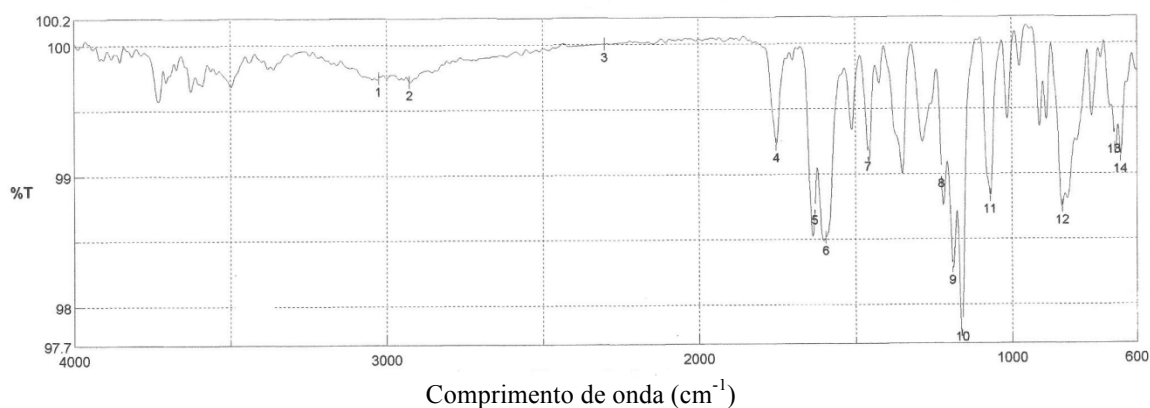


Figura 27. Espectro de infra-vermelho do produto de acilação enzimática da naringenina

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 sugerem a presença de uma ligação éster na posição C-4', elucidando a posição de acilação.

Os dados de IV confirmam a presença do éster.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 28) pode ser apresentada.

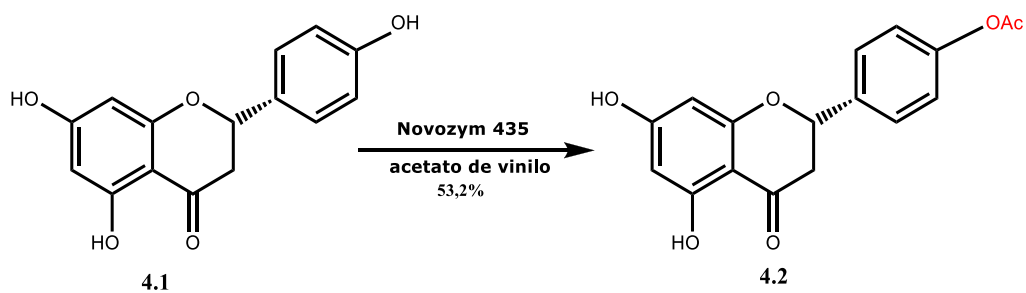


Figura 28. Representação esquemática da acilação enzimática da naringenina com Novozym 435 e acetato de vinilo

3.2.3. Acilação enzimática da naringina

A naringina ou 7-rhamnoglucoside de naringenina, é uma flavanona natural isolada principalmente de frutas cítricas, como *Citrus paradisi* e casca de *Citrus aurantium*. Este composto é utilizado industrialmente em perfumes, bebidas, adoçantes, estabilizantes e óleos vegetais em produtos de panificação, principalmente devido as suas propriedades antioxidantes. A naringina mostrou atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiúlceras, antiviral, anticarcinogênica e hipolipemiante. A naringina pode também proteger as células musculares lisas vasculares, aumentando a força e a resistência dos vasos sanguíneos, o que reduz os efeitos aterogênicos.

Este substrato tem vários grupos hidroxilo (fenólicos, primários e secundários) que podem sofrer acilação.

Uma vez que a acilação da posição 4'-OH da naringenina apenas foi possível mediante a utilização de uma quantidade muito elevada de biocatalisador, não é de esperar que esta posição sofra acilação em condições reacionais normais. De fato, os grupos hidroxilo secundários do açúcar e sobretudo o grupo hidroxilo primário podem ter um acesso mais facilitado ao local ativo da enzima, uma vez que esta porção da molécula é mais flexível.

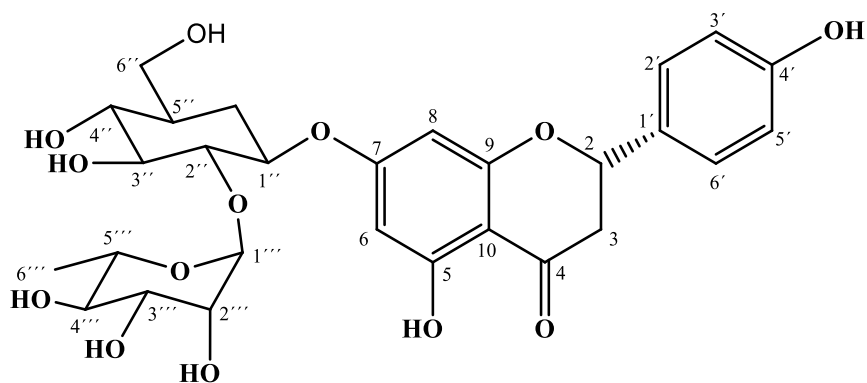


Figura 29. Estrutura da naringina

Dada a elevada polaridade da molécula não foram testados solventes hidrofóbicos.

Por outro lado, os dados da literatura referem que a lipase PS não aceita substratos glicosilados, ao contrário do que acontece com a Novozym 435. Assim, para este substrato, foi selecionada Novozym 435 como catalisador e a acetona como solvente.

Efetuuou-se a reação em maior escala usando acetona como solvente e acetato de vinilo como agente acilante na presença de CALB a 50°C e 200 rpm.

Isolou-se um único produto com rendimento de 94,12 %.

Para confirmação estrutural do produto de reação de acilação da naringina com CALB e acetato de vinilo, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, a naringina, para efeitos de comparação.

O espectro de RMN ^1H da naringina (figura 30) forneceu sinais característicos do núcleo flavonóide, como δ_{H} 11,88 ppm, atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo do carbono C-5, envolvido numa ligação de hidrogénio intramolecular com o carbonilo da posição C-4, e δ_{H} 9,33 ppm, referente ao hidroxilo presente em C-4'. Também se

observaram dois dubletos centrados a δ_{H} 7,14 ppm (2H, d, $J=8,65$ Hz, H-2' e H-6') e δ_{H} 6,64 ppm (2H, d, $J=8,65$ Hz, H-3' e H-5'), a região de deslocamento químico de hidrogénios aromáticos presentes no anel C. O duplo dubleto centrado a δ_{H} 5,93 com $J=4,30$ Hz é referente aos hidrogénios da posição H-6 e H-8 do anel A. O triplete observado a δ_{H} 4,91 ppm, $J=7,32$ Hz e 5,38 Hz refere-se ao H-6''. O dubleto a 1,04 ppm, $J=5,46$ Hz é característico do grupo metílico presente na posição 6'''.

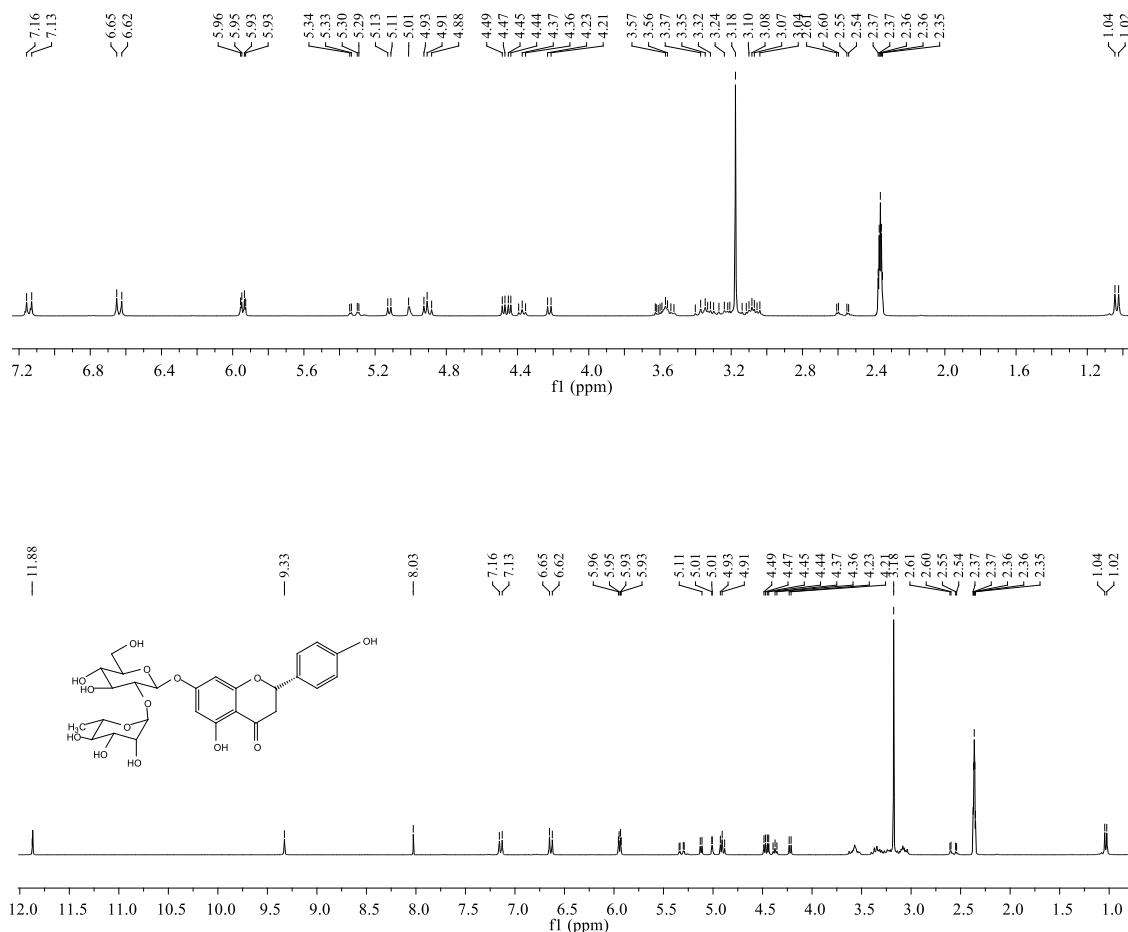


Figura 30. Espectro RMN ^1H da naringina

O espectro de RMN ^{13}C da naringina (figura 31) forneceu os desvios dos 27 carbonos da estrutura da naringina, 16,22 ppm ($\text{CH}_3\text{-C-6}''$); 40,77 ppm (C-3); 59,06 ppm

C-6''); 66,76 ppm (C-5'''); 68,20 (C-3'''); 68,94 ppm (C-2'''); 69,20 ppm (C-4''); 70,59 ppm (C-4''); 74,52 ppm (C-2''), 75,59 ppm (C-5''); 75,92 ppm (C-3''); 77,00 ppm (C-2); 93,91 ppm (C-8); 95,13 ppm (C-6); 96,44 ppm (C-1'''); 99,04 ppm (C-1''); 102,12 ppm (C-10); 114,07 ppm (C-3'e C-5'); 127,11 ppm (C-6'); 127,24 ppm (C-2'); 127,46 ppm (C-1'); 157,00 ppm (C-4'); 161,86 ppm (C-9); 162,26 ppm (C-5); 164,10 ppm (C-7); 196,17 ppm (C-4).

A caracterização de cada carbono foi auxiliada pela análise dos espectros DEPT 90 e 135 (figuras 32 e 33). Assim, foi possível concluir que dos 27 carbonos da naringina, 7 são quaternários, 17 são CH, 2 são CH₂ e 1 é CH₃.

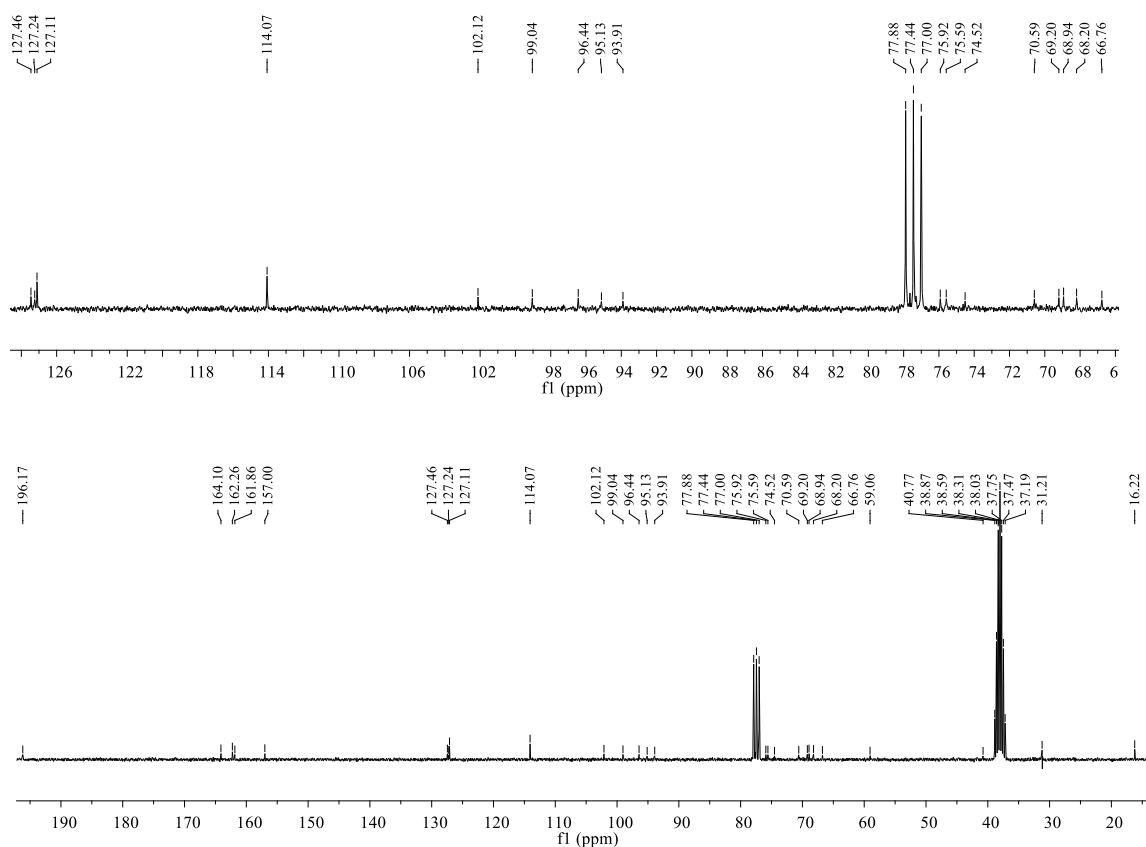


Figura 31. Espectro RMN ¹³C da naringina

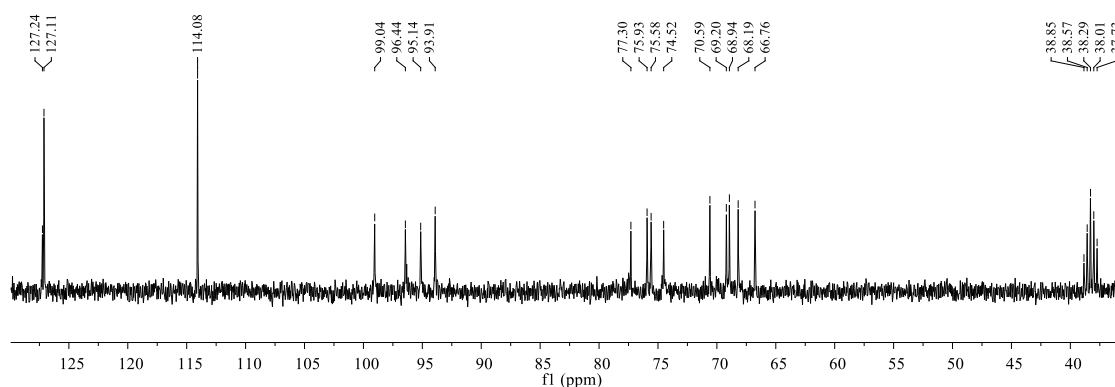


Figura 32. Espectro DEPT 90 da naringina

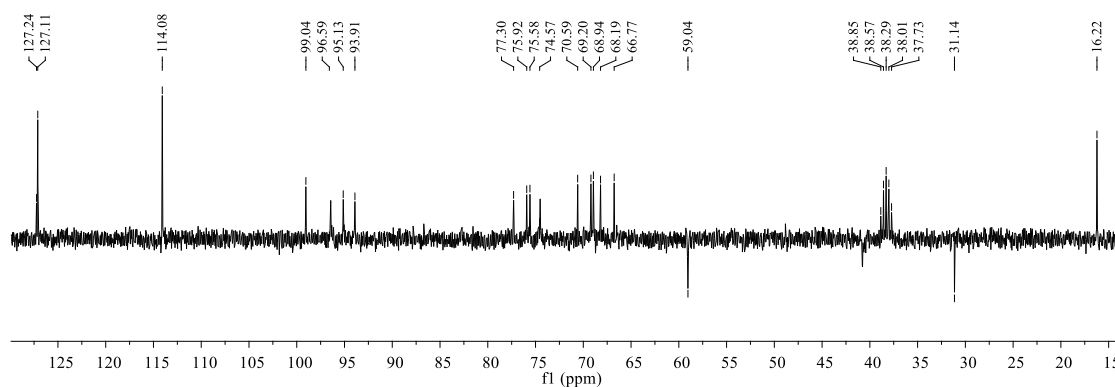


Figura 33. Espectro DEPT 135 da naringina

Na análise do espectro de RMN ^1H do produto da reação de acilação enzimática da naringina (figura 34), observaram-se alterações nos sinais dos hidrogénios da porção açúcar.

Resultados e discussão

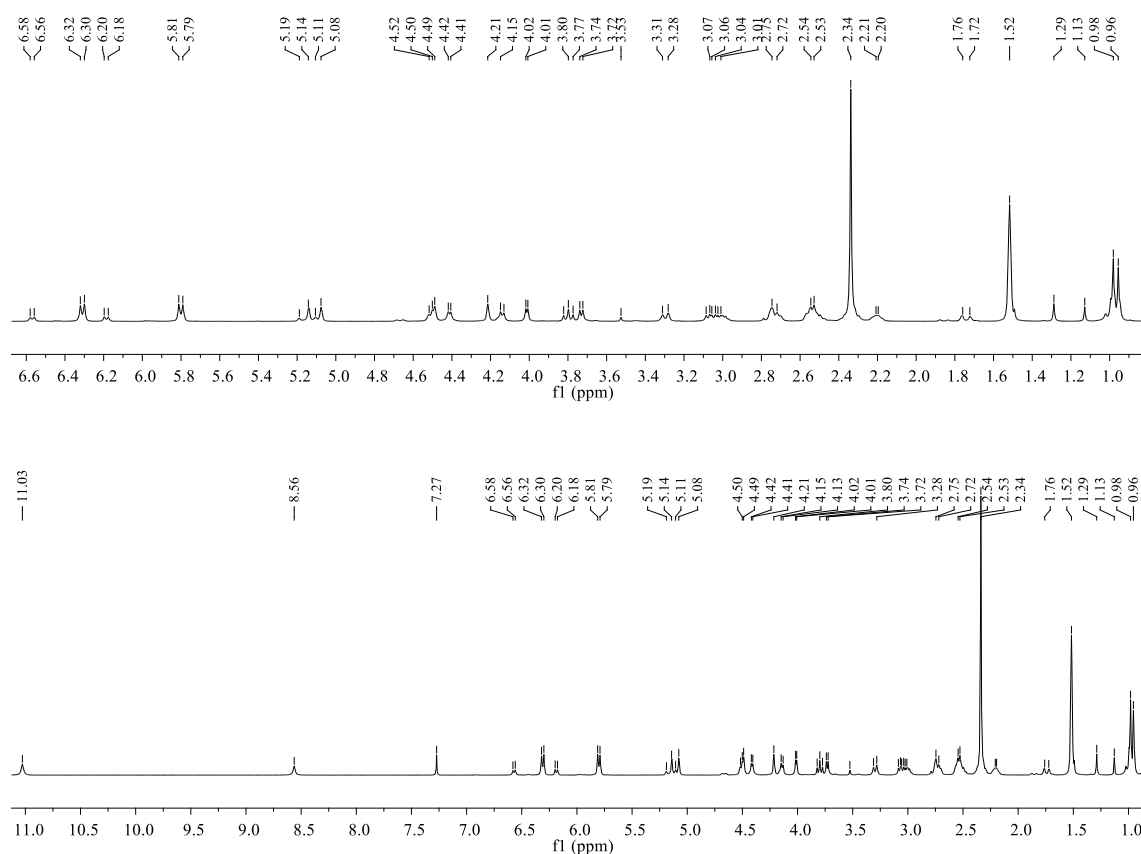


Figura 34. Espectro RMN ¹H do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo

Observando o espectro RMN ¹³C do produto da acilação enzimática da naringina (figura 35) verificou-se o aparecimento dos sinais com desvios químicos 18,20 ppm e 18,56 ppm, referentes a carbonos metílicos e a 168,44 ppm e 168,66 ppm referentes a carbonos carbonilo. Além disso verificou-se que os sinais atribuídos a C-5'', C-6'', C-3''', C-4''', C-5''', C-6''', sofreram alterações. As alterações dos restantes carbonos não foram significativas.

A análise dos DEPT 90 e 135 do produto da acilação enzimática da naringina (figuras 36 e 37) permitiu concluir que os sinais a 168,44 ppm e 168,66 ppm correspondem a carbonos quaternários e os sinais a 18,20 ppm e 18,56 ppm a carbonos metílicos.

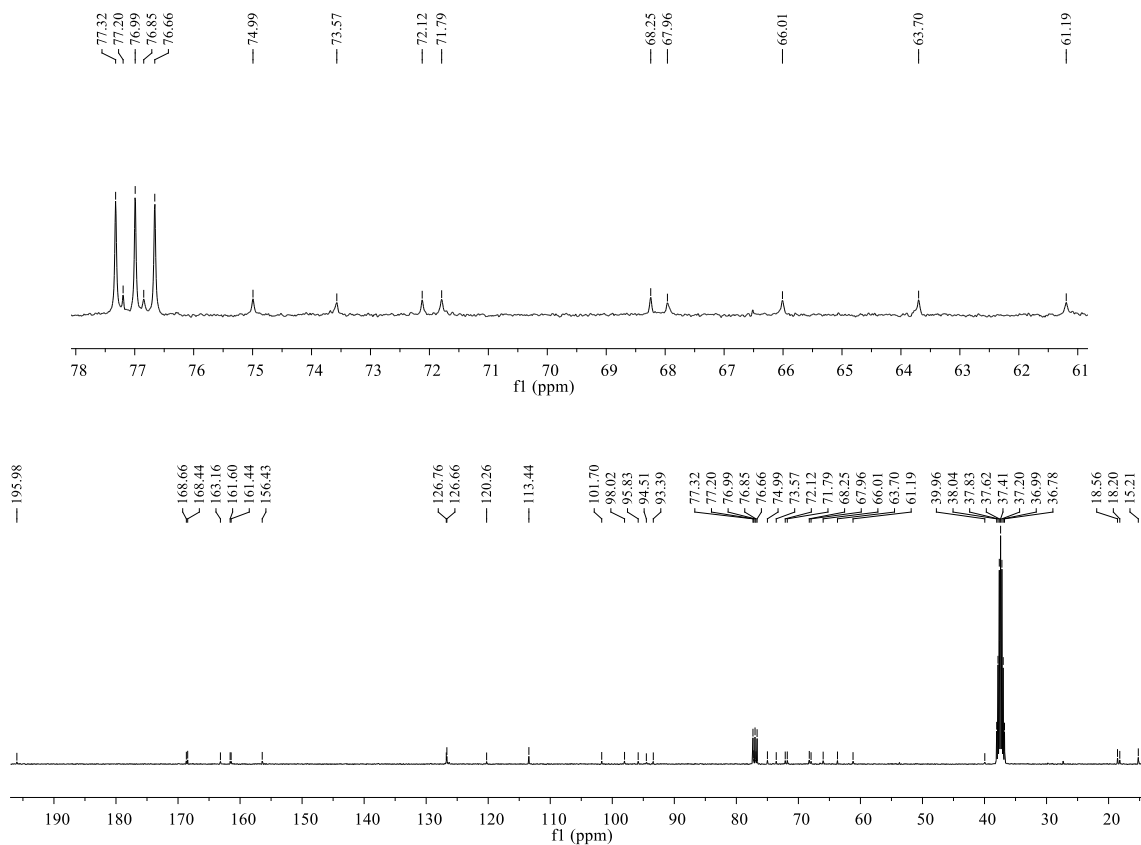


Figura 35. Espectro RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo

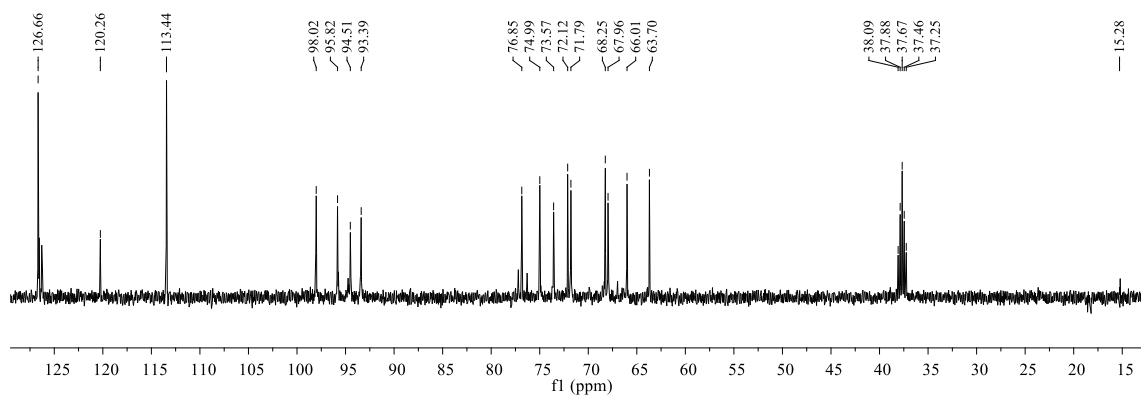


Figura 36. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo

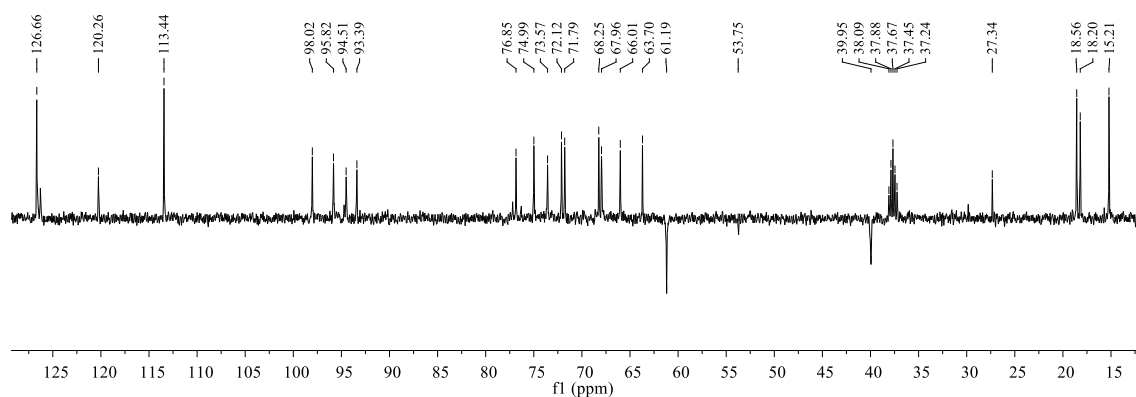


Figura 37. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática da naringina com acetato de vinilo

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 sugerem a presença de ligações éster nas posições C-4''' e C-6'', elucidando as posições de acilação.

Os dados de IV confirmam a presença do éster.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 38) pode ser apresentada.

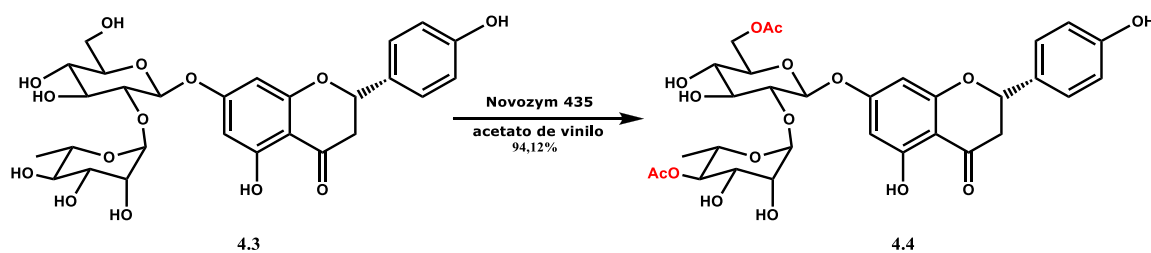


Figura 38. Representação esquemática da acilação enzimática da naringina com Novozym 435 e acetato de vinilo

3.2.4. Acilação enzimática do resveratrol

O resveratrol, trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, é um composto fenólico pertencente à classe dos estilbenos. É encontrado em uvas, bebidas à base de uvas, frutas e amendoins. O resveratrol é uma fitoalexina que protege as plantas da radiação ultravioleta e de ataques de patógenos e parasitas. O resveratrol também é reconhecido como um agente bioativo benéfico para a saúde humana, uma vez que possui atividade antioxidante, cardioprotetora, anti-inflamatória, antitumoral, neuroprotectora, e imunomoduladora. O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: o trans-resveratrol e o cis-resveratrol. O isômero trans é a forma mais estável do resveratrol e a farmacologicamente ativa.

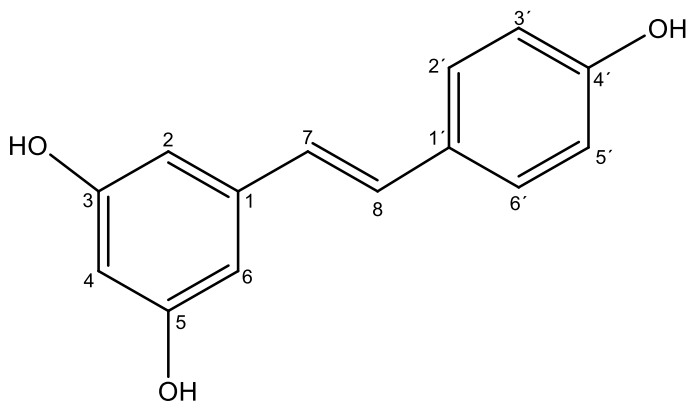


Figura 39. Estrutura do resveratrol

Para este substrato foi realizado um *screening* de enzimas e solventes usando acetato de vinilo como dador de acilo.

	Acetona	Acetonitrilo	Etilmetilcetona	Acetato de etilo	Tolueno
CALB	+	+	++	-	+++
PS	-	-	-	-	+
CR	-	nd	-	nd	-

Tabela 3. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática do resveratrol usando acetato de vinilo como dador de acilo

A análise da tabela permitiu concluir que a reação com CALB é possível em todos os solventes com exceção do acetato de etilo, no entanto é favorecida em tolueno. Para a lipase PS apenas se observou reação em tolueno. Com a lipase CR não se observou reação com nenhum dos solventes.

Efetuaram-se reações em maior escala usando tolueno como solvente para as enzimas CALB e PS a 50°C e 200 rpm.

Em ambos os casos foi possível isolar produtos. Por CCF verificou-se que os produtos eram iguais quando o acetato de vinilo foi usado com agente acilante.

Para confirmação estrutural do produto de reação de acilação do resveratrol com CALB e acetato de vinilo, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia

em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, o resveratrol, para efeitos de comparação.

O espectro RMN ^1H do resveratrol (figura 40) indicou a presença de sete hidrogénios ligados a carbonos aromáticos: três dubletos a δ_{H} 6,20 ppm, δ_{H} 6,60 ppm, δ_{H} 7,17 ppm e um triplete a δ_{H} 5,96 ppm, sendo que alguns hidrogénios apresentam o mesmo desvio devido à simetria da molécula. Os sinais característicos dos hidrogénios ligados à olefina são observados como dubletos a δ_{H} 6,56 ppm e δ_{H} 6,60 ppm., com valores da constante de acoplamento J^3 16,5 Hz e 16,3 Hz, respetivamente, o que comprova a presença do estereoisómero trans do resveratrol. A presença dos hidrogénios dos grupos OH também detetados como dois singuletos a δ_{H} 8,90 ppm e δ_{H} 9,24 ppm, sendo que as integrações permitem afirmar que o sinal a δ_{H} 8,24 ppm diz respeito a dois hidrogénios e o a δ_{H} 8,90 ppm a um hidrogéno.

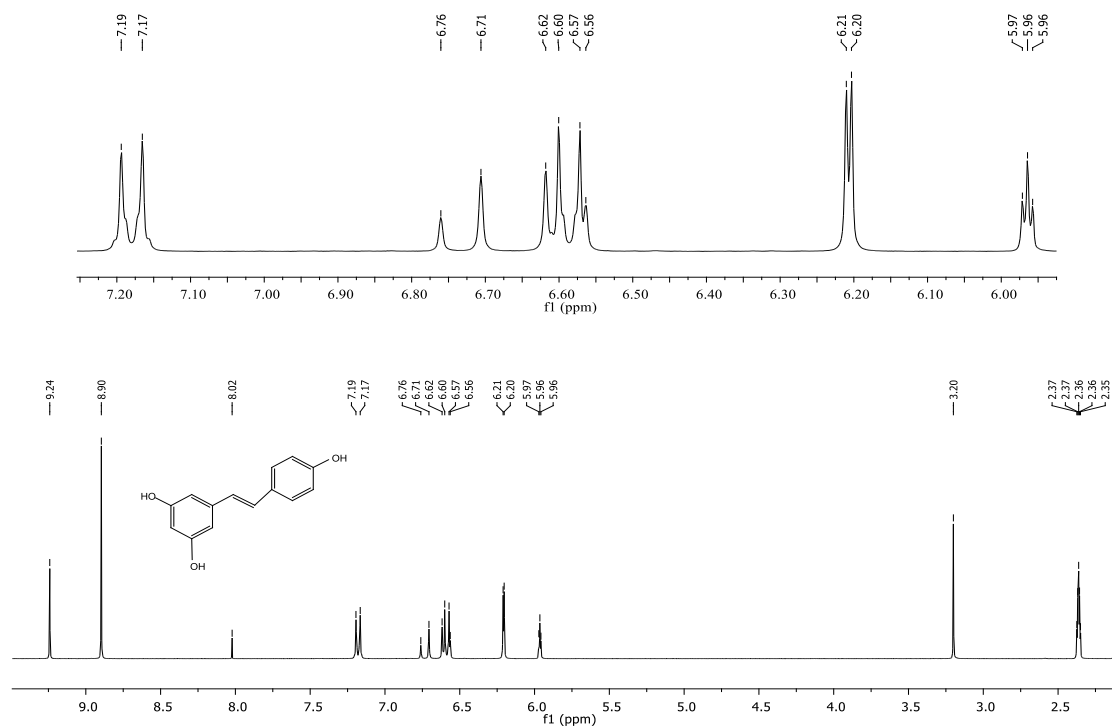


Figura 40. Espectro RMN ^1H do resveratrol

A análise do espectro RMN ^{13}C do resveratrol (figura 41), permite observar os sinais dos 12 carbonos aromáticos do resveratrol 100,57 ppm (C-4); 103,05 ppm (C-2 e C-6); 114,33 ppm (C-3' e C-5'); 126,94 ppm (C-1'); 126,56 ppm (C-2' e C-6'); 138,13 ppm (C-1); 156,33 ppm (C-4'); 157,60 ppm (C-3 e C-5). Ainda se observaram os sinais na região das olefinas correspondentes aos carbonos não saturados sp^2 , 124,51 ppm (C-7), 126,69 ppm (C-8).

A caracterização de cada carbono foi auxiliada pela análise do espectro DEPT 90/135 (figura 42). Conclui-se assim que dos 14 carbonos presentes no resveratrol, 5 são quaternários e 9 são CH.

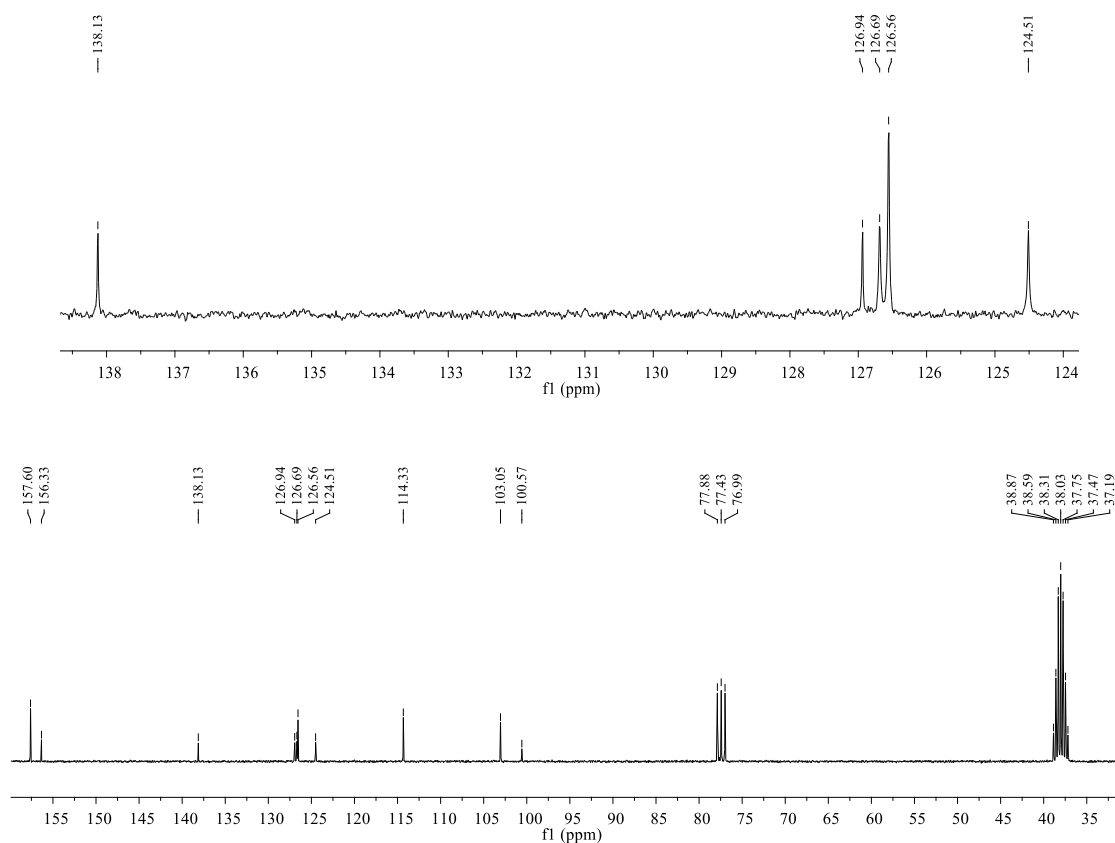


Figura 41. Espectro RMN ^{13}C do resveratrol

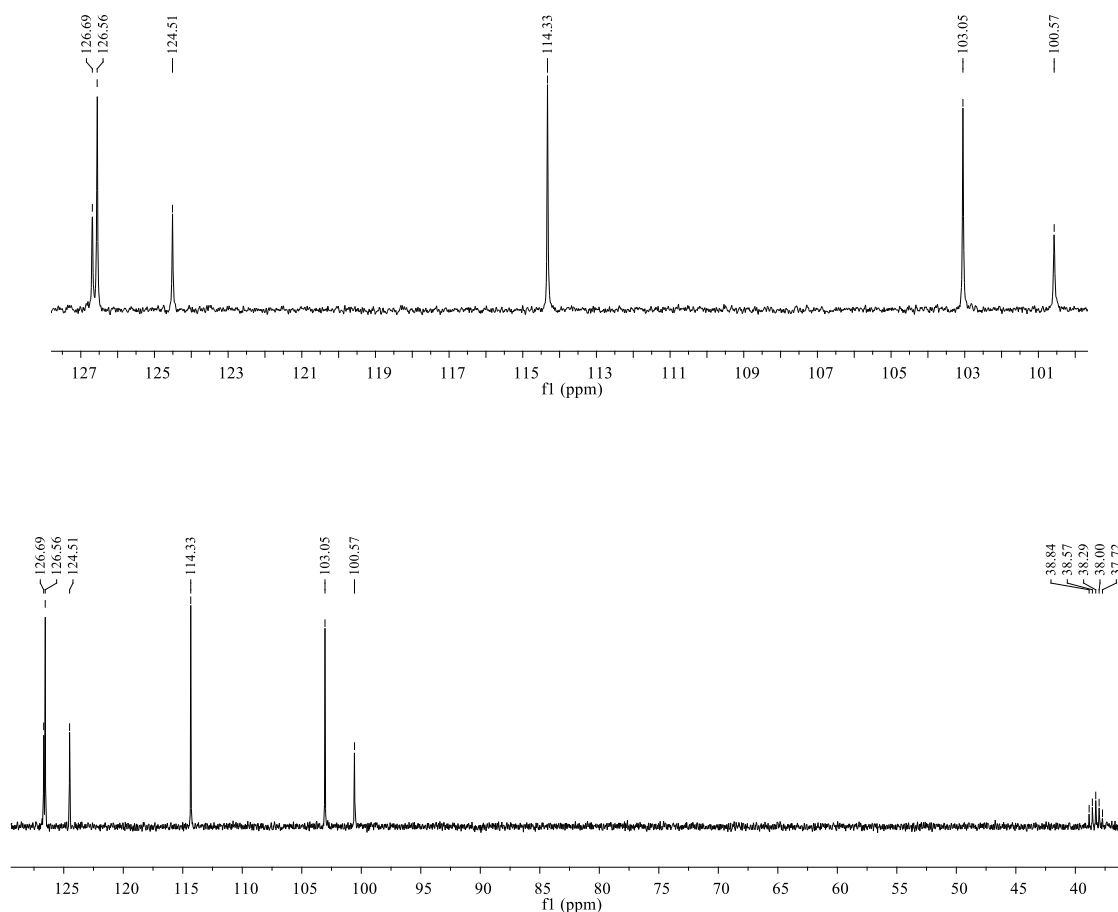


Figura 42. Espectro DEPT 90/135 do resveratrol

Comparando os espectros RMN ^1H do resveratrol (figura 40) com o do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo (figura 43) verificou-se que os sinais a δ_{H} 9,24 ppm e δ_{H} 8,90 ppm são substituídos por um único sinal a δ_{H} 9,52 ppm e o aparecimento de sinais a δ_{H} 2,10 ppm e δ_{H} 2,11 ppm, característicos de grupos metílicos.

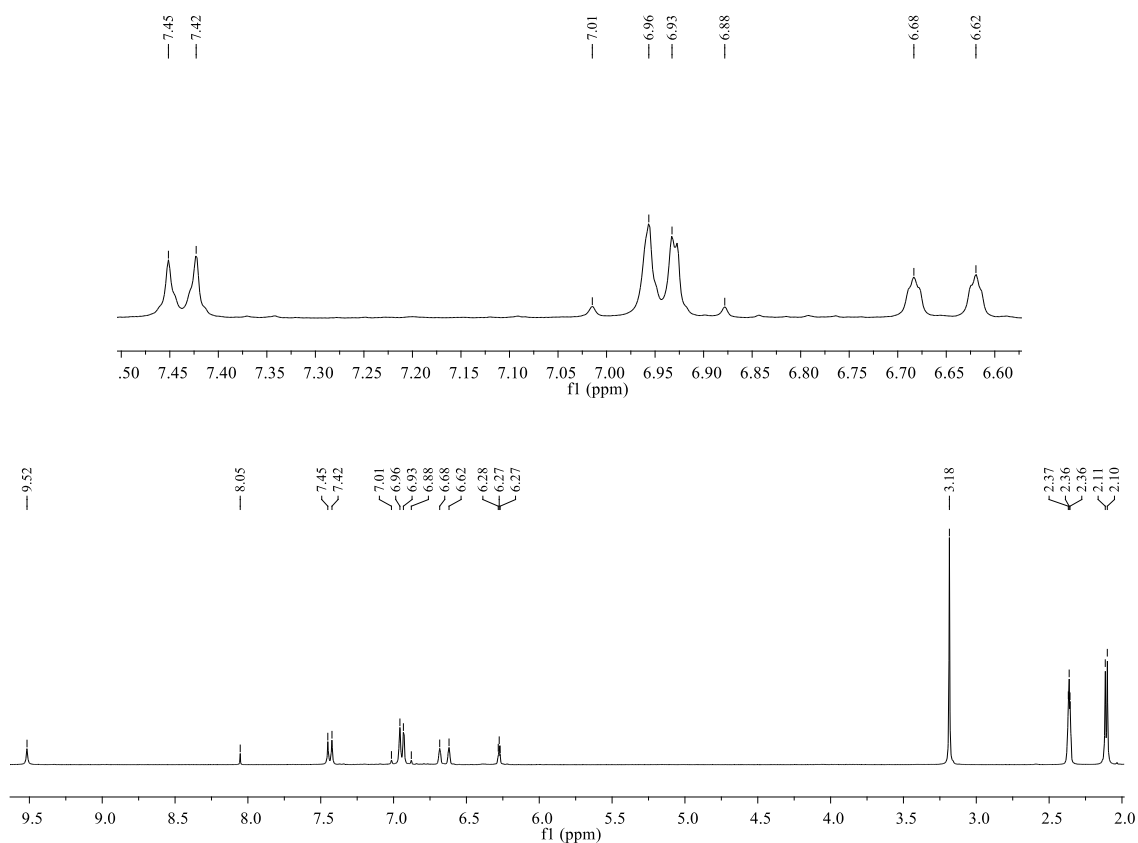


Figura 43. Espectro RMN ¹H do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo

No espectro de RMN ¹³C do produto de acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo (figura 44), verificou-se o aparecimento dos sinais a 168,00 ppm e 168,08 ppm referentes aos carbonos carbonilos dos grupos acetato e os sinais a 19,14 ppm e 19,17 ppm relativos aos grupos metílicos dos grupos acetato. Adicionalmente, verificaram-se alterações nos desvios do C-2, C-3, C-4, C-6, C-3', C-4' e C-6'. As alterações dos sinais dos restantes carbonos não foram significativas.

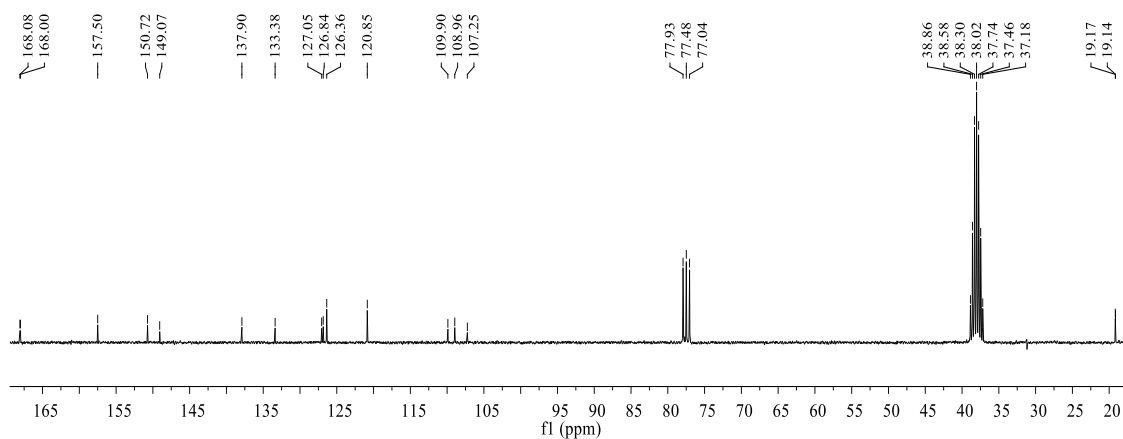


Figura 44. Espectro RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo

Os espectros DEPT 90 e 135 (figura 45 e 46) confirmaram que os sinais a 168,00 ppm e 168,08 ppm correspondem a carbonos quaternários e a presença de dois grupos CH_3 com desvios 19,14 ppm e 19,17 ppm.

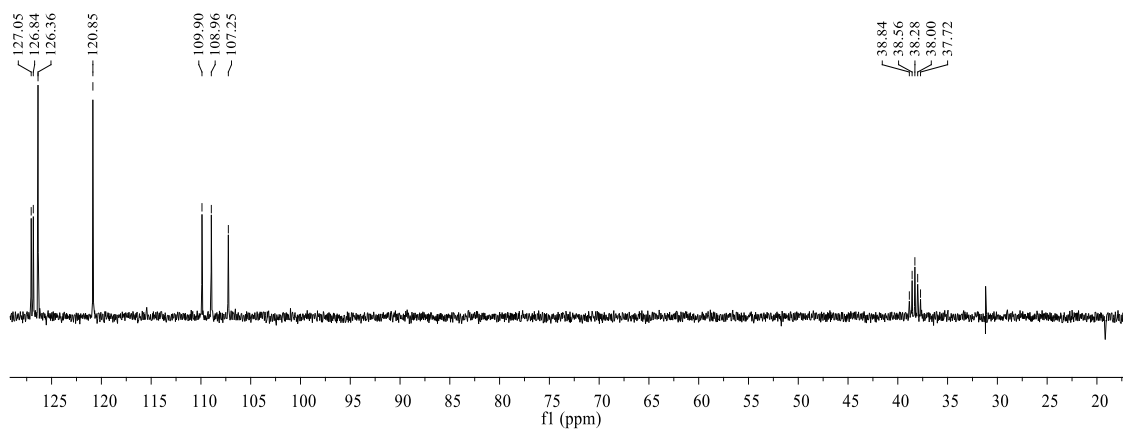


Figura 45. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo

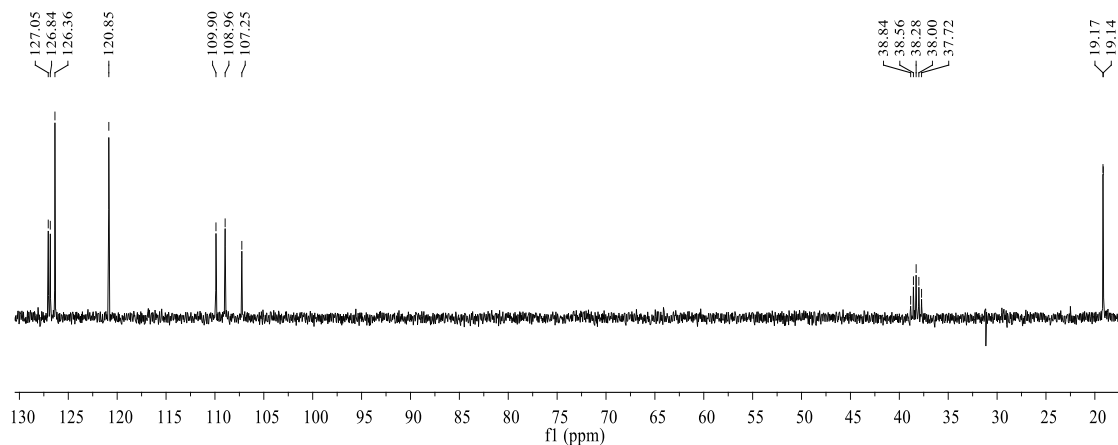


Figura 46. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e acetato de vinilo

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 sugerem a presença de uma ligação éster nas posições C-3 e C-4', elucidando as posições de acilação.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 47) pode ser apresentada.

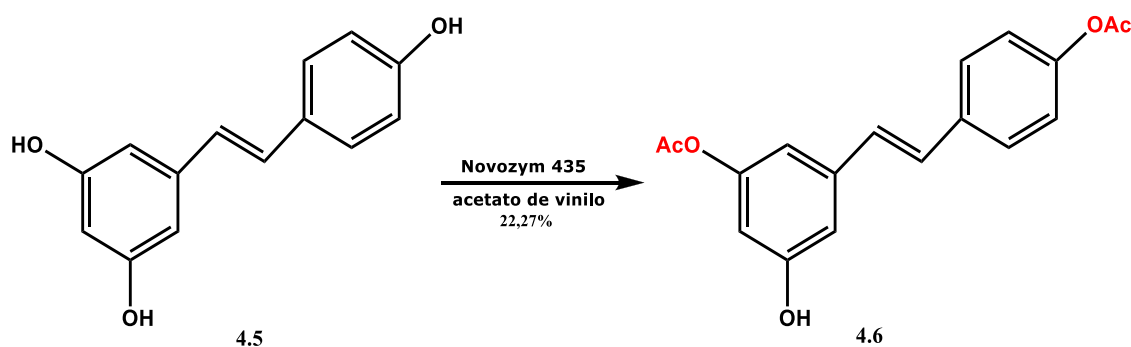


Figura 47. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com Novozym 435 e acetato de vinilo

Para confirmação estrutural do produto de reação de acilação do resveratrol com PS e acetato de vinilo, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, o resveratrol, para efeitos de comparação.

Comparando os espectros RMN ^1H do resveratrol (figura 40) com o do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo (figura 48) verificou-se que os sinais a δ_{H} 9,24 ppm e δ_{H} 8,90 ppm são substituídos por um único sinal a δ_{H} 9,50 ppm e o aparecimento de sinais a δ_{H} 2,10 ppm δ_{H} 2,11 ppm, característicos de grupos metílicos.

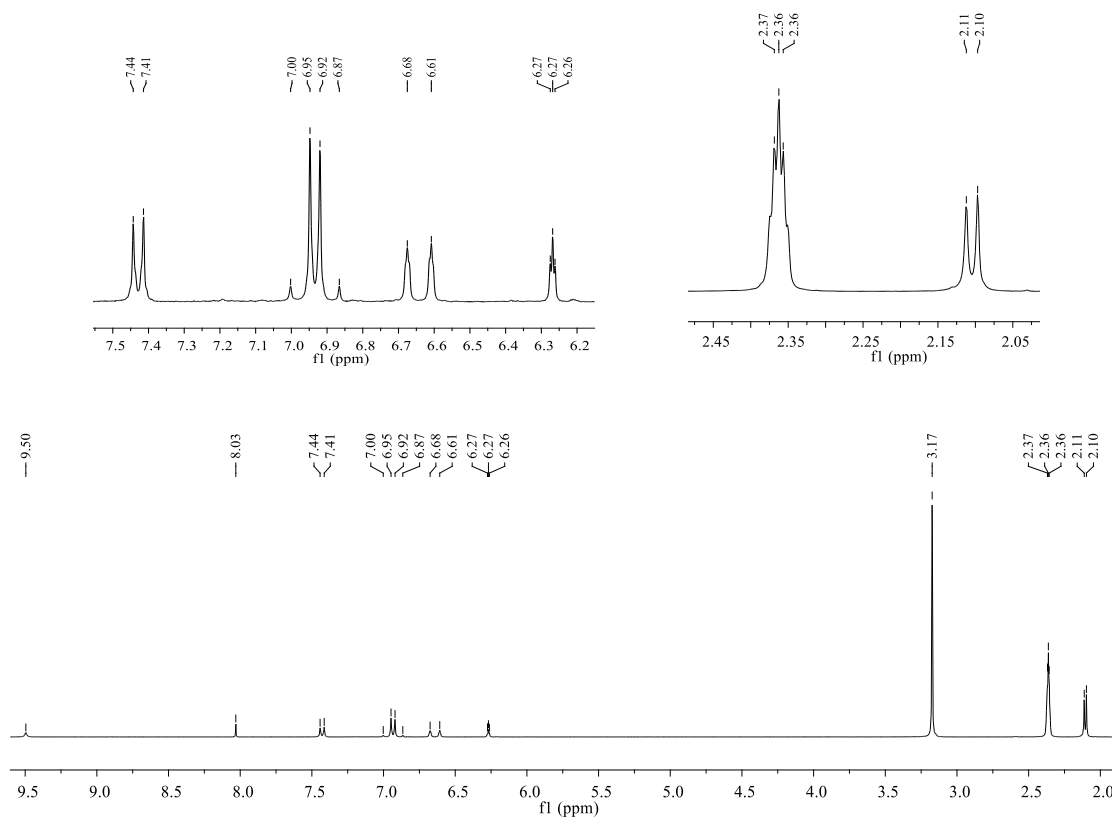


Figura 48. Espectro RMN ^1H do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo

No espectro de RMN ^{13}C do produto de acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo (figura 49), verificou-se o aparecimento dos sinais a 167,98 ppm e 168,05 ppm referentes aos carbonos carbonilos dos grupos acetato e o sinal a 19,16 ppm relativo aos grupos metílicos dos grupos acetato. Adicionalmente, verificaram-se alterações nos desvios do C-2, C-3, C-4, C-6, C-3', C-4' e C-6'. As alterações dos sinais dos restantes carbonos não foram significativas.

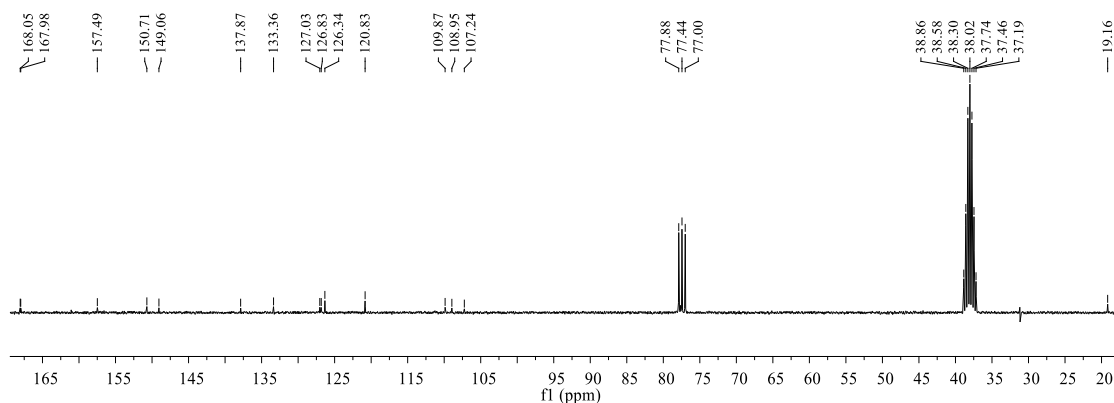


Figura 49. Espectro RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo

Os espectros DEPT 90 e 135 (figura 50 e 51) confirmaram que os sinais a 167,98 ppm e 168,05 ppm correspondem a carbonos quaternários e a presença de dois grupos CH_3 com desvios 19,16 ppm.

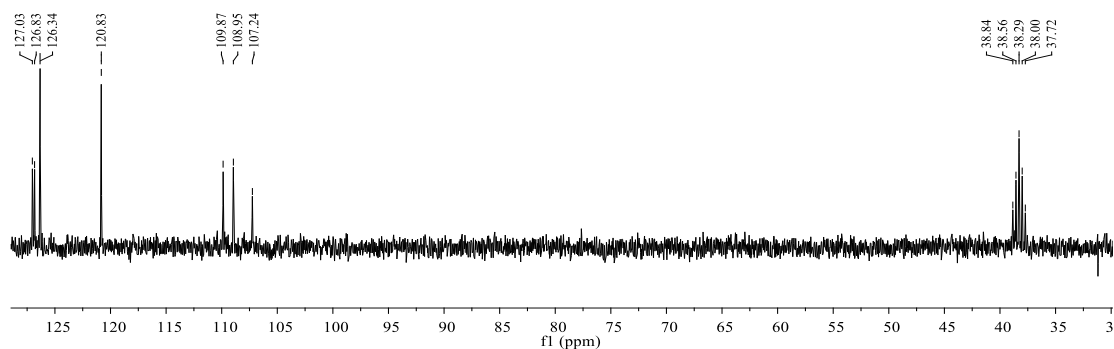


Figura 50. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo

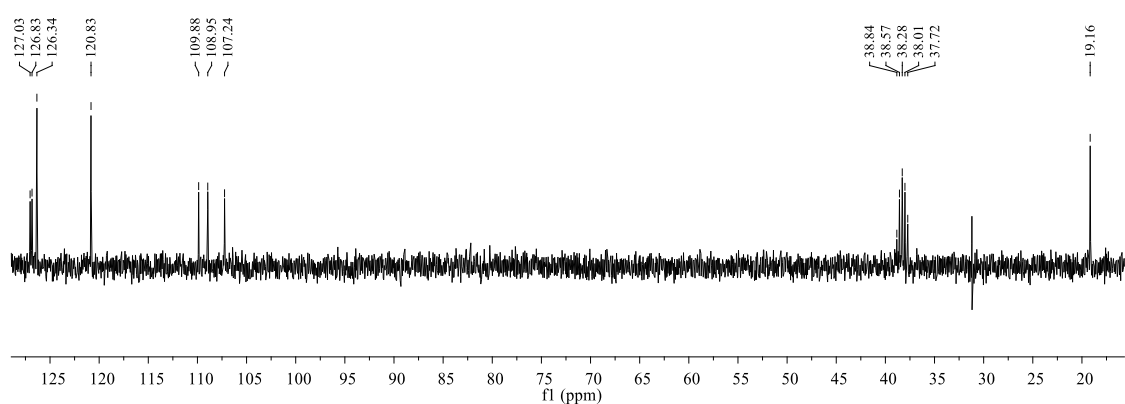


Figura 51. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 sugerem a presença de uma ligação éster nas posições C-3 e C-4', elucidando as posições de acilação.

Os dados de IV confirmam a presença do éster.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 52) pode ser apresentada.

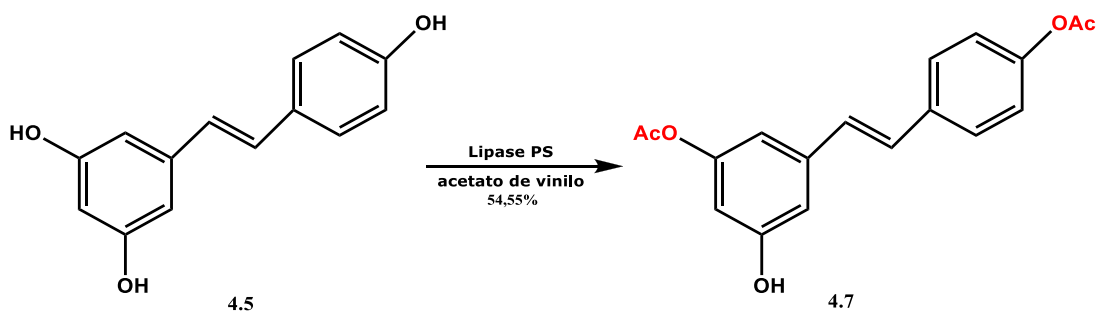


Figura 52. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com PS e acetato de vinilo

Efetuararam-se reações em maior escala usando tolueno como solvente e butirato de vinilo e decanoato de vinilo como agentes acilantes na presença de CALB e PS a 50°C e 200 rpm.

Com a CALB foi possível isolar um único produto com os dois agentes acilantes. Por CCF verificou-se que os produtos eram diferentes quando o butirato de vinilo foi usado com agente acilante.

No entanto, com a lipase PS apenas se isolou produto com o butirato de vinilo.

Para confirmação estrutural do produto de reação de acilação do resveratrol com CALB e butirato de vinilo, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, o resveratrol, para efeitos de comparação.

Observando o espectro RMN ^1H do produto da acilação do resveratrol com CALB e butirato de vinilo (figura 53), verificou-se o aparecimento de sinais à direita do espectro

referentes a grupos metílicos e metilenos. Além disso, observou-se o desaparecimento do sinal a δ_H 9,24 ppm, sugerindo que a acilação ocorre na posição 4'.

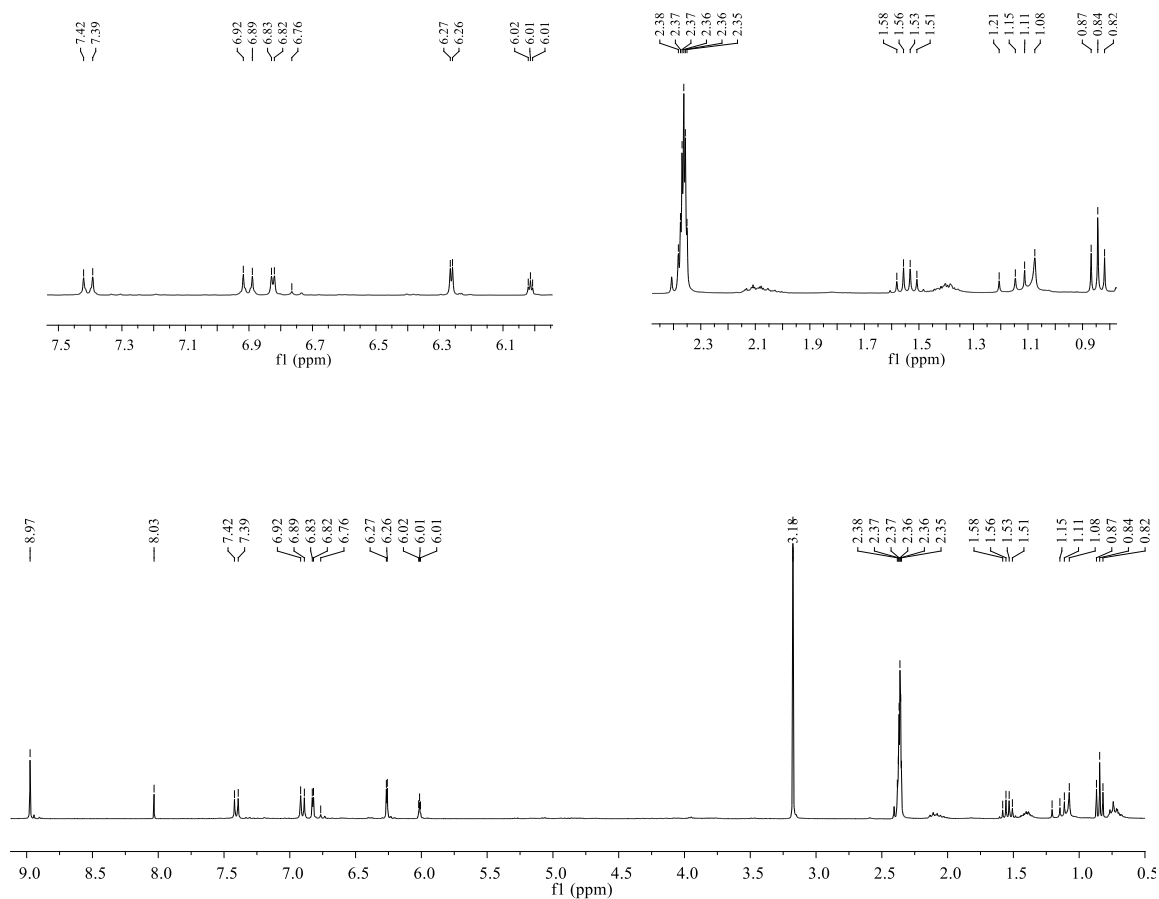


Figura 53. Espectro RMN 1H do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo

No espectro RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo (figura 54) verificou-se o aparecimento dos sinais a 11,62 ppm, 16,16 ppm e 170,64 ppm. Adicionalmente, observaram-se alterações significativas nos desvios do C-4, C-3' e C-5'. As restantes alterações não foram significativas.

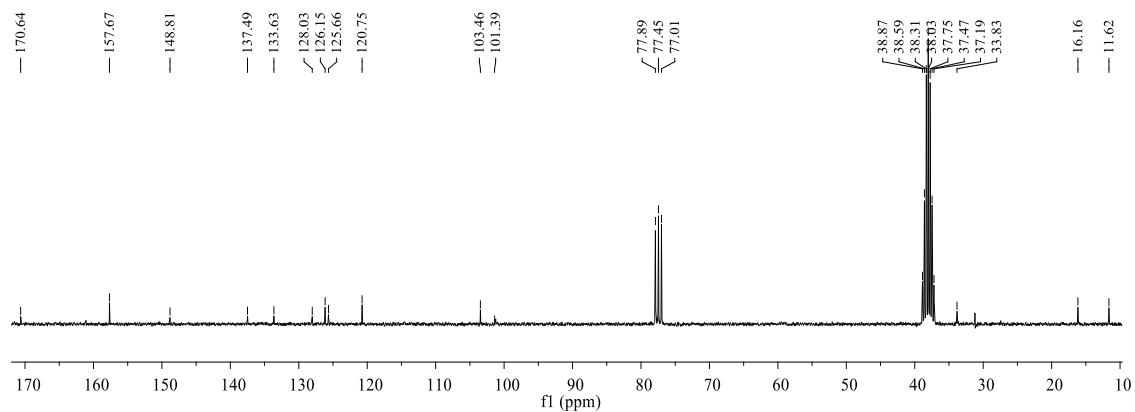


Figura 54. Espectro RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo

Nos espectros DEPT 90 e 135 (figura 55 e 56) confirmou-se que o sinal a 170,64 ppm corresponde a um carbono quaternário, que o sinal a 11,62 ppm corresponde ao carbono do grupo metílico e os sinais a 16,16 ppm e 33,83 ppm correspondem a carbonos de grupos metileno.

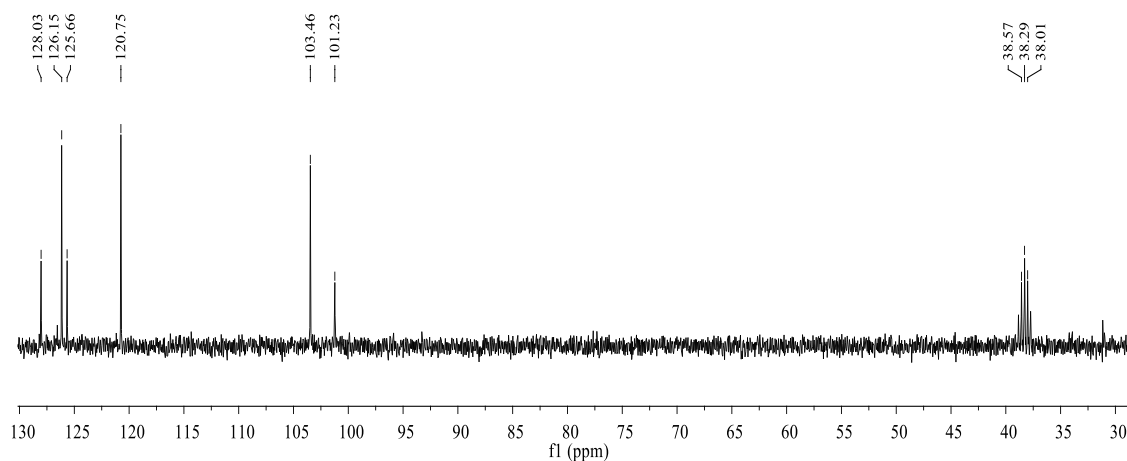


Figura 55. Espectro DEPT 90 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo

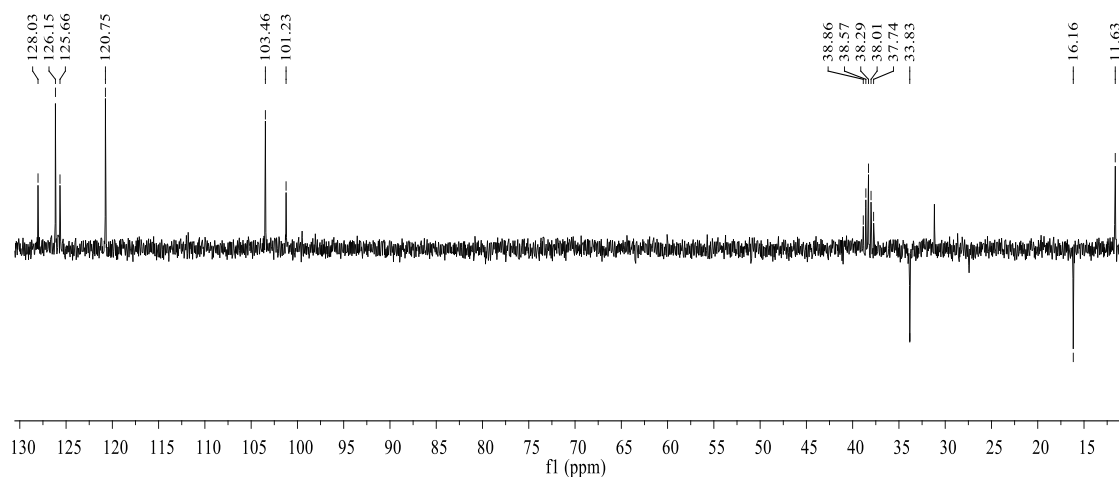


Figura 56. Espectro DEPT 135 do produto da acilação enzimática do resveratrol com CALB e butirato de vinilo

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 sugerem a presença de uma ligação éster na posição C-4', elucidando a posição de acilação.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 57) pode ser apresentada.

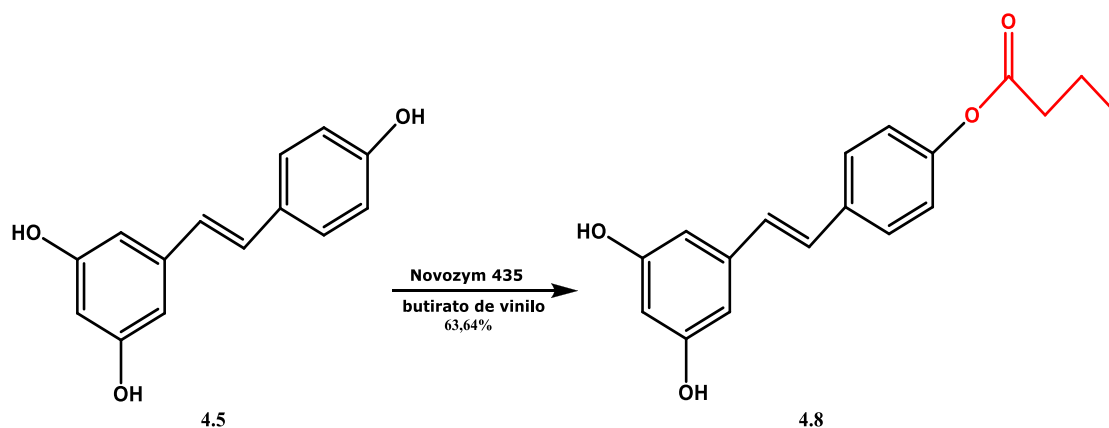


Figura 57. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com Novozym 435 e butirato de vinilo

Para confirmação estrutural do produto de reação de acilação do resveratrol com PS e butirato de vinilo, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, o resveratrol, para efeitos de comparação.

Observando o espectro RMN ^1H do produto da acilação do resveratrol com PS e butirato de vinilo (figura 58), verificou-se o aparecimento de sinais à direita do espectro referentes a grupos metílicos e metilenos. Além disso, observou-se que os sinais a δ_{H} 9,24 ppm e a δ_{H} 8,90 ppm foram substituídos por um único sinal a δ_{H} 9,50 ppm.

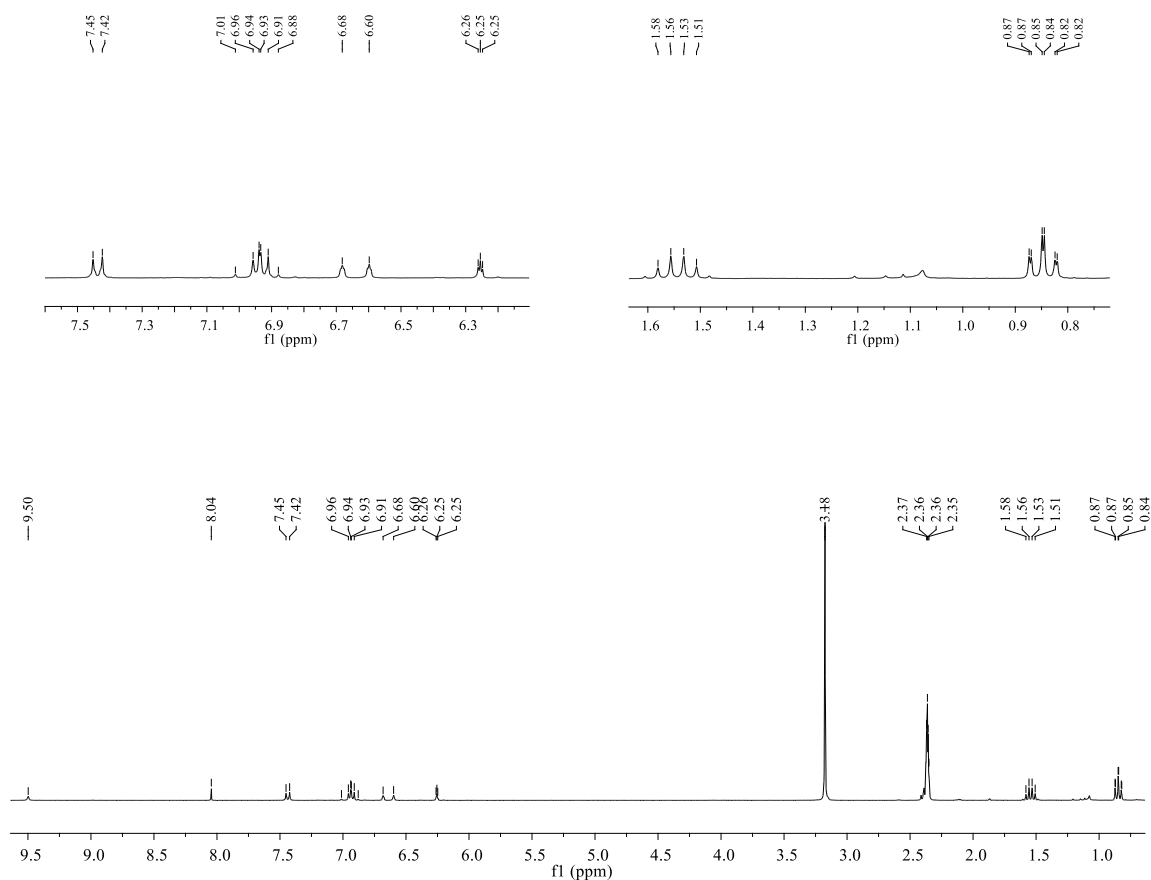


Figura 58. Espectro RMN ^1H do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo

No espectro RMN ^{13}C do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo (figura 59) verificou-se o aparecimento dos sinais a 11,65 ppm, 16,16 ppm, 16,20 ppm, 170,56 ppm e 170,64 ppm. Adicionalmente, observaram-se alterações significativas nos desvios do C-3', C-4', C-5', C-2 e C-4. As restantes alterações não foram significativas.

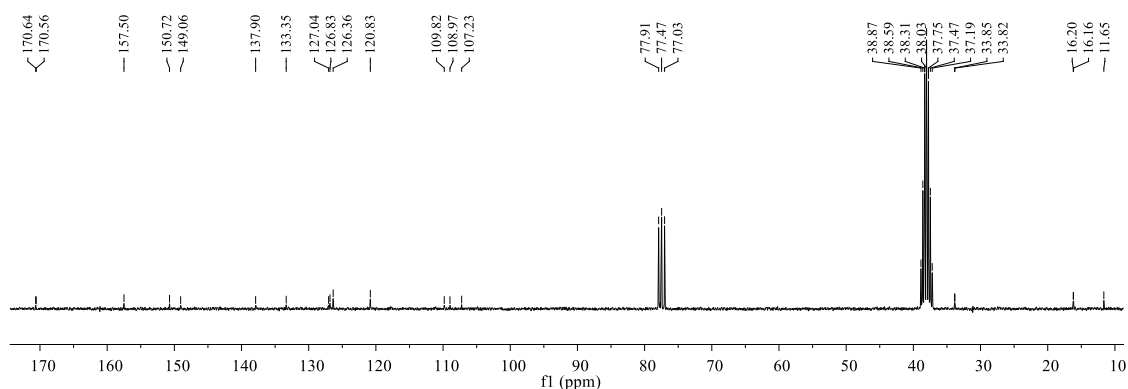


Figura 59. Espectro RMN ^{13}C do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo

Os espectros de DEPT 90 e 135 (figura 60 e 61) permitiram concluir que os sinais a 170,56 ppm e 170,64 ppm são relativos a carbonos quaternários, o sinal a 11,65 ppm corresponde ao carbono do grupo metílico e os sinais a 16,16 ppm e 33,90 ppm correspondem a carbonos de grupos metilenos.

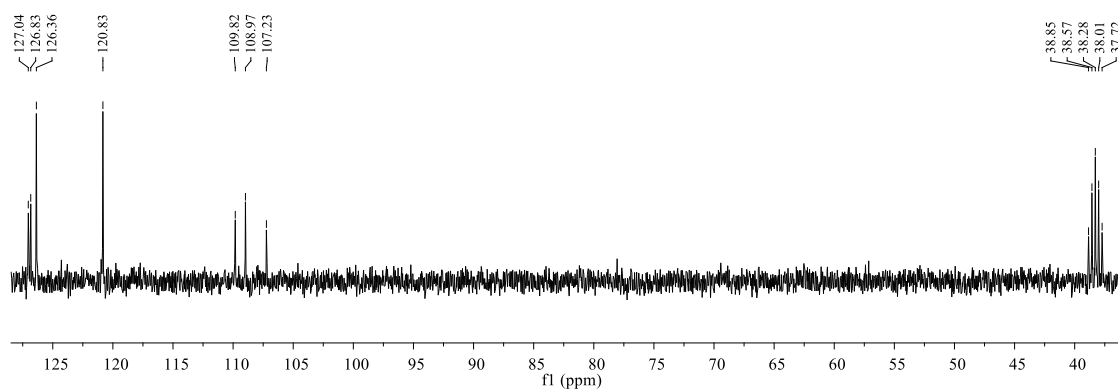


Figura 60. Espectro DEPT 90 do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo

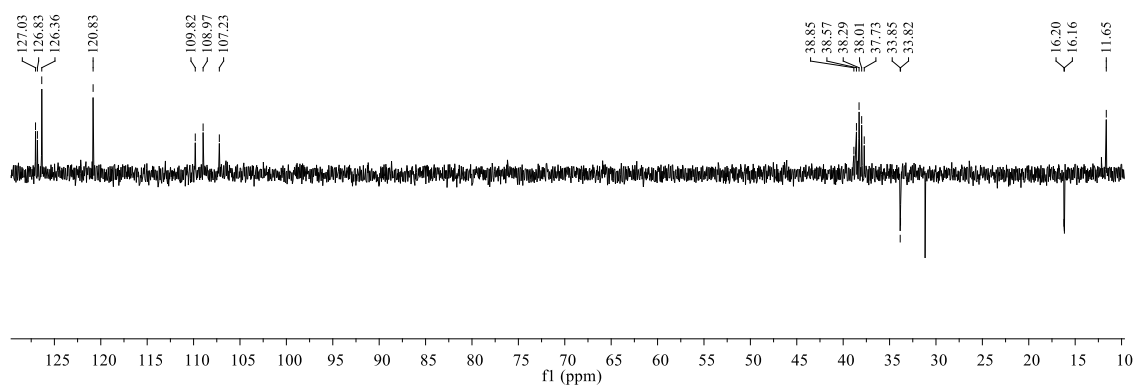


Figura 61. Espectro DEPT 135 do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 sugerem a presença de uma ligação éster nas posições C-3 e C-4', elucidando as posições de acilação.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 62) pode ser apresentada.

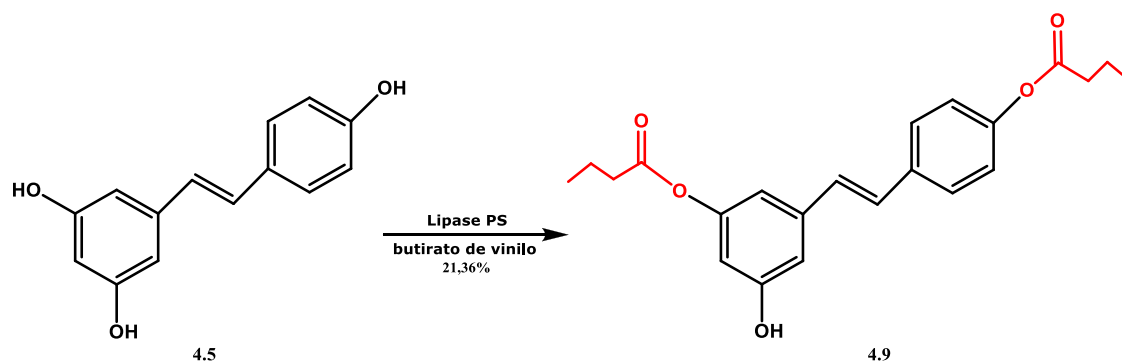


Figura 62. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com PS e butirato de vinilo

Para confirmação estrutural do produto de reação de acilação do resveratrol com CALB e decanoato de vinilo, procedeu-se a purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, o resveratrol, para efeitos de comparação.

Observando o espectro RMN ^1H do produto da acilação do resveratrol com PS e decanoato de vinilo (figura 63), verificou-se o aparecimento de sinais à direita do espectro referentes a grupos metílicos e metílenos. Além disso, observou-se que os sinais a δ_{H} 9,24 ppm e a δ_{H} 8,90 ppm foram substituídos por um único sinal a δ_{H} 10,89 ppm. A integração permitiu concluir que este sinal corresponde a um hidrogénio, sugerindo que o substrato foi diacilado.

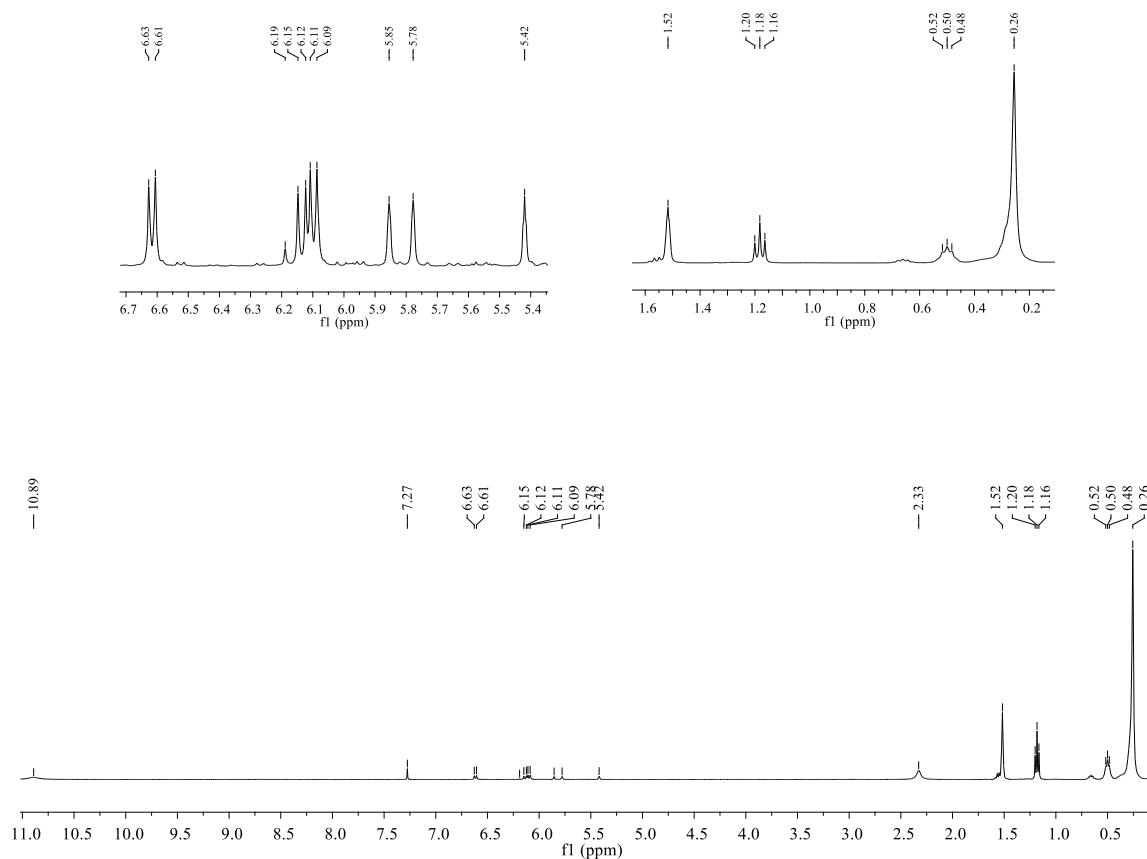


Figura 63. Espectro RMN ¹H do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com CALB e decanoato de vinilo

No espectro RMN ¹³C do produto da acilação enzimática do resveratrol com PS e decanoato de vinilo (figura 64) verificou-se o aparecimento de sinais à direita do espectro que correspondem aos carbonos dos grupos metílicos e metilenos das cadeias alifáticas do decanoato e a 170,17 ppm e 170,26 ppm que correspondem aos carbonos carbonílicos. Adicionalmente, observaram-se alterações significativas nos desvios do C-2, C-4, C-6, C-1', C-3', C-4', C-5'. As restantes alterações não foram significativas.

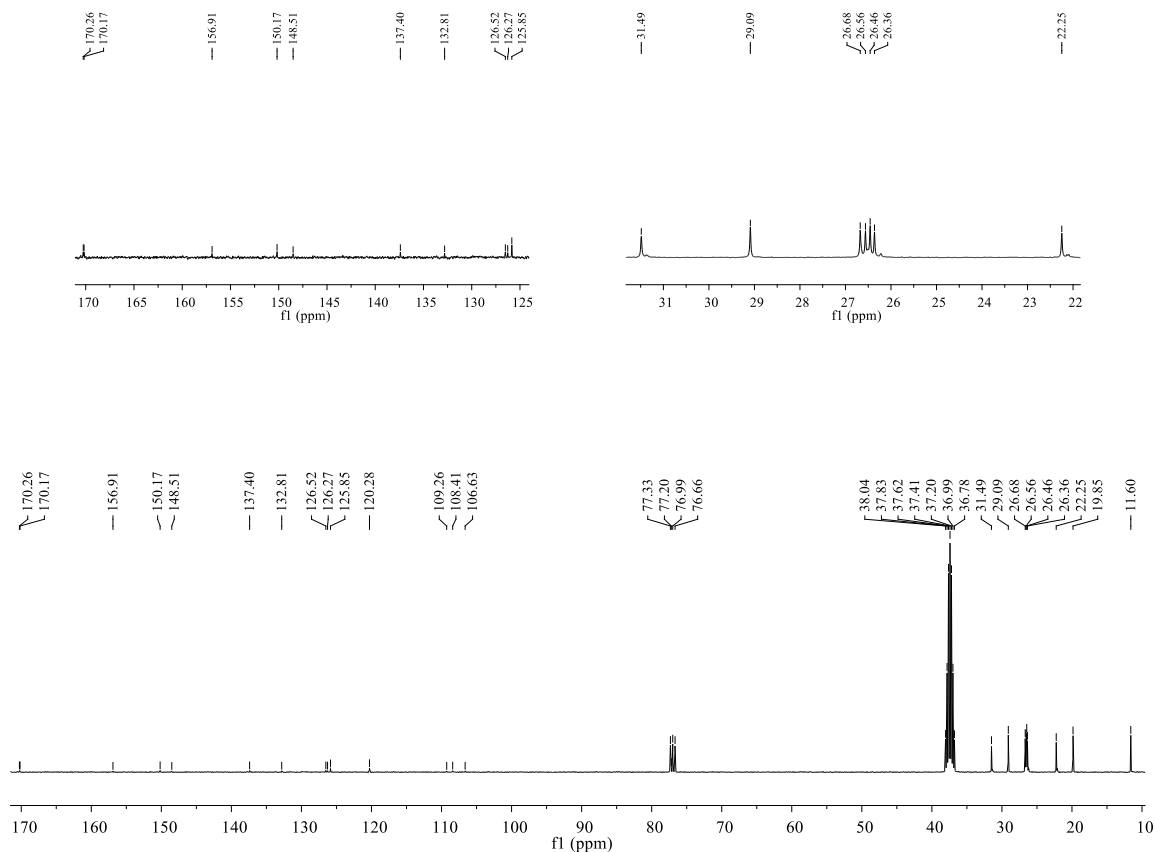


Figura 64. Espectro RMN ^{13}C do produto da reação de acilação enzimática do resveratrol com CALB e decanoato de vinilo

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C sugerem a presença de uma ligação éster nas posições C-3 e C-4', elucidando as posições de acilação.

Os dados de IV confirmam a presença do éster.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 65) pode ser apresentada.

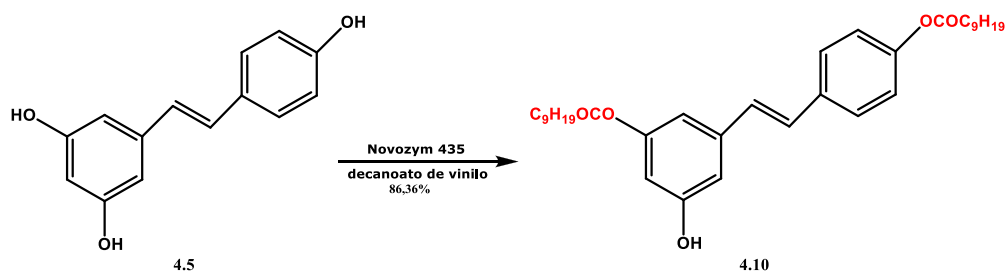


Figura 65. Representação esquemática da acilação enzimática do resveratrol com Novozym 435 e decanoato de vinilo

Para este substrato foi realizado um *screening* de enzimas e solventes usando cinamato de vinilo como dador de acilo.

	Acetona	Acetonitrilo	Etilmetilcetona	Tolueno
CALB	-	-	-	-
PS	-	-	-	-

Tabela 4. Otimização das condições de reação para a acilação enzimática do resveratrol usando cinamato de vinilo como dador de acilo

A análise da tabela permitiu concluir que não se observou reação com nenhum dos solventes para ambas as enzimas quando o cinamato de vinilo foi usado como agente acilante.

3.3. Estudo de reações de alcoólise enzimática em substratos polifenólicos acilados

3.3.1. Acilações químicas

3.3.1.1. Síntese da naringenina per-acilada

A naringenina foi acilada usando anidrido acético como agente acilante, piridina, 4-DMAP como catalisador e diclorometano como solvente. A reação terminou ao fim de duas horas. Após o *work up* obteve-se um sólido amarelo com rendimento 95,5% que foi caracterizado por RMN unidimensional.

Para confirmação estrutural do produto da acilação química da naringenina, procedeu-se à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, a naringenina, para efeitos de comparação.

Por comparação dos espectros RMN¹H da naringenina (figura 20) e do produto da acilação química da naringenina (figura 66) foi possível observar o desaparecimento dos sinais a δ_H 11,94 ppm, δ_H 10,45 ppm e δ_H 9,30 ppm referentes aos hidrogénios dos grupos hidroxilo e o aparecimento de sinais a δ_H 2,12 ppm e δ_H 2,15 ppm característicos de prótons metílicos.

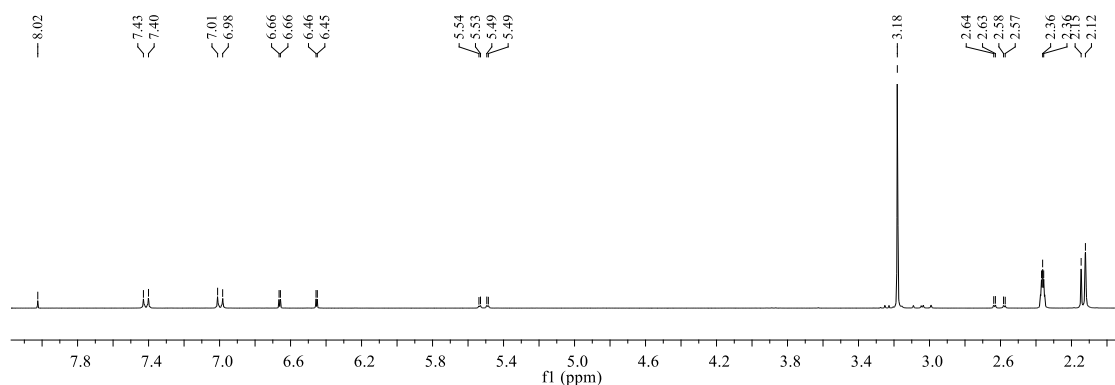


Figura 66. Espectro RMN ^1H do produto da acilação química da naringenina

No espectro RMN ^{13}C do produto da acilação química da naringenina (figura 67) foi possível observar o aparecimento de sinais a 167,11 ppm, 167,61 ppm e 168,06 ppm referentes aos carbonos carbonilos dos grupos acetato e a 19,06 ppm, 19,11 ppm e 19,15 ppm relativos aos carbonos dos grupos metílicos dos grupos acetato. Os sinais dos 21 carbonos da naringenina per-acilada são possíveis de observar sendo que alguns hidrogénios apresentam o mesmo valor de desvio.

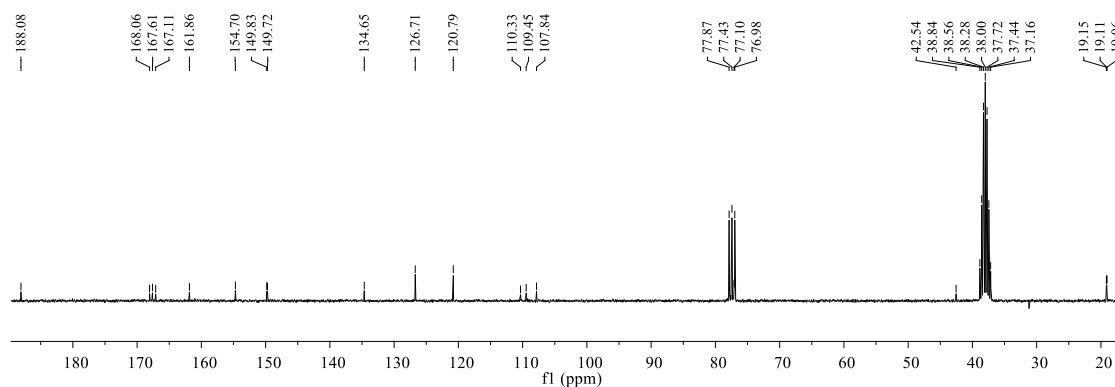


Figura 67. Espectro RMN ^{13}C do produto da acilação química da naringenina

Os DEPT 90 e 135 (figura 68 e 69) permitiram concluir que os sinais a 167,11 ppm, 167,61 ppm e 168,06 ppm correspondem a carbonos quaternários e a 19,06 ppm, 19,11 ppm e 19,15 ppm correspondem a grupos metílicos.

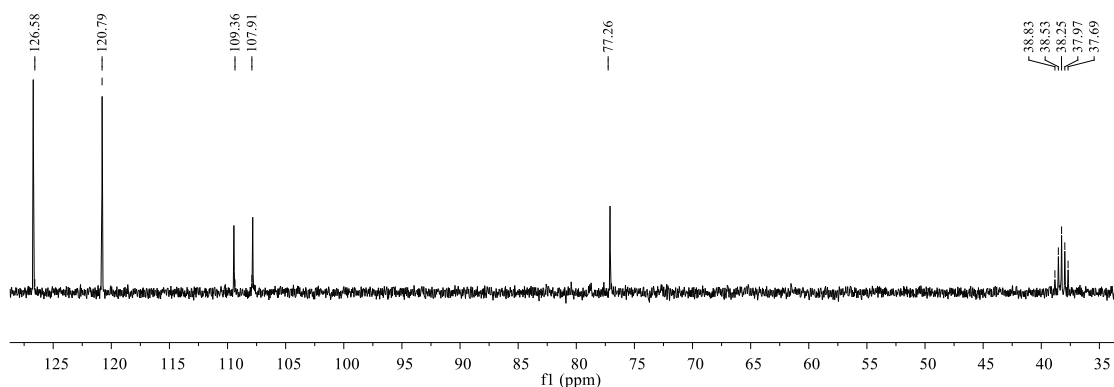


Figura 68. Espectro DEPT 90 do produto da acilação química da naringenina

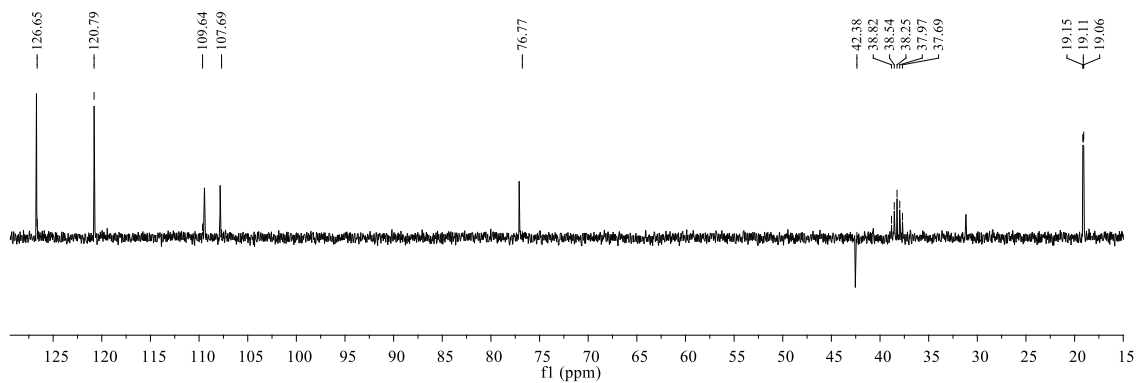


Figura 69. Espectro DEPT 135 do produto da acilação química da naringenina

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 permitem confirmar as posições de acilação.

Os dados de IV confirmam a presença do éster.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 70) pode ser apresentada.

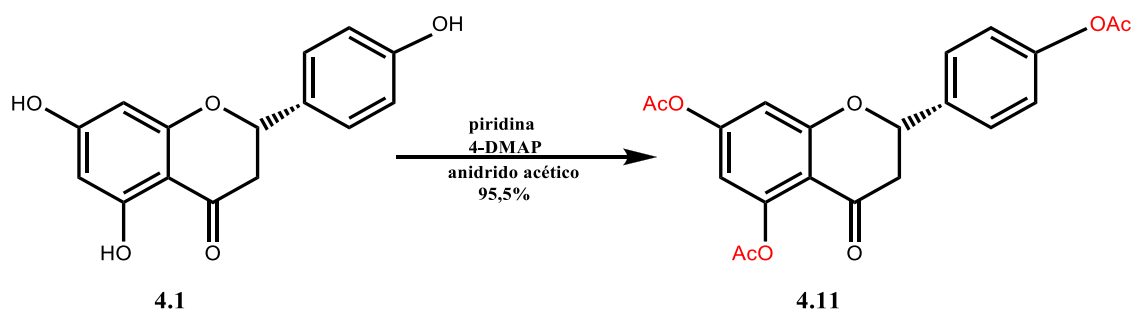


Figura 70. Representação esquemática da acilação química da naringenina

3.3.1.2. Síntese do resveratrol per-acilado

A acilação química do resveratrol foi efetuada usando trifluorometanosulfonato de bismuto III como catalisador à temperatura ambiente e na presença de um grande excesso de anidrido acético. Após o *work up* obteve-se um pó acastanhado com rendimento de 88,6 %. A caracterização do produto foi feita por RMN unidimensional.

Para confirmação estrutural do produto da acilação química do resveratrol, procedeu-se à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, o resveratrol, para efeitos de comparação.

Por observação do espectro de RMN ^1H do produto da acilação química do resveratrol (figura 71) e comparando com o espectro RMN ^1H do resveratrol (figura 40) foi possível verificar o desaparecimento dos sinais dos prótons dos grupos hidroxilo a δ_{H}

9,24 ppm e a δ_H 8,90 ppm e o aparecimento de dois sinais a δ_H 1,90 ppm e δ_H 1,91 ppm, com intensidade 1:2, referentes aos prótons metílicos dos grupos acetato.

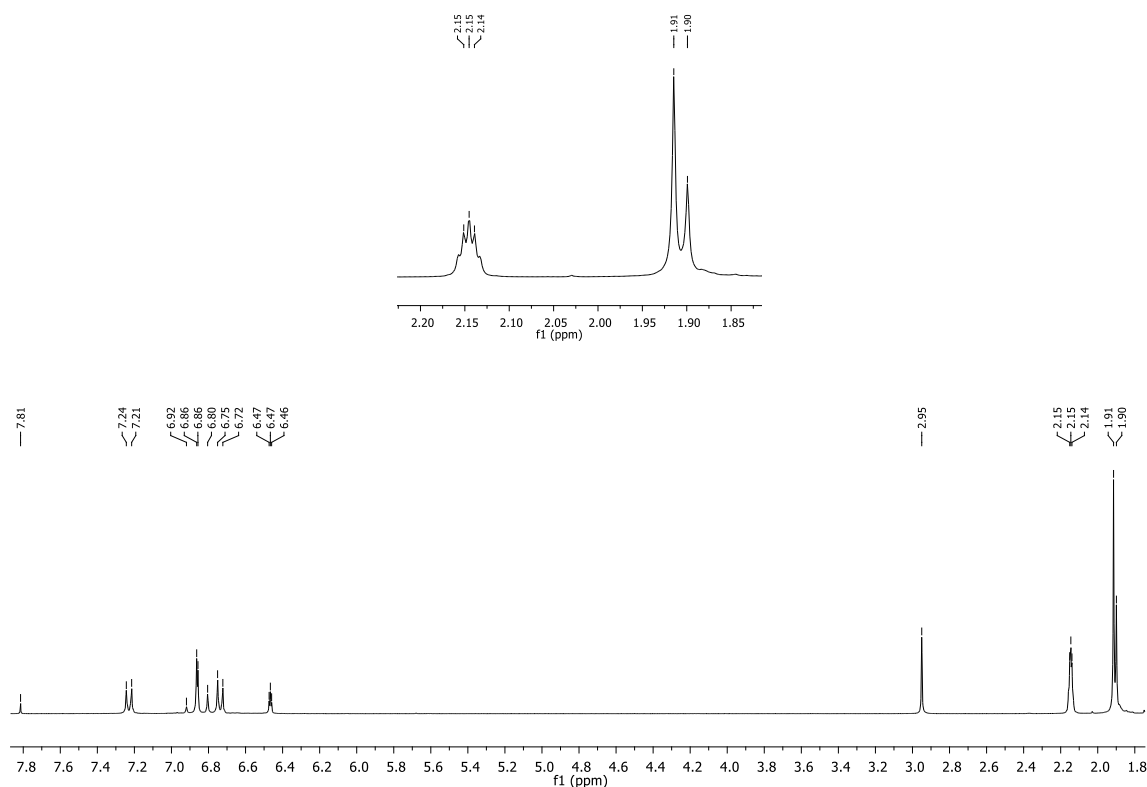


Figura 71. Espectro de RMN 1H do produto da acilação química do resveratrol

Quando se observou o espectro de RMN ^{13}C do produto da acilação química do resveratrol (figura 72) verificou-se o aparecimento de sinais a 167,84 ppm e 168,01 ppm com intensidade 2:1, relativos aos carbonos carbonílicos dos grupos acetato e a 19,09 ppm e 19,13 ppm, com intensidade 2:1, relativos aos carbonos dos grupos metilos do acetato. Os sinais dos 20 carbonos do resveratrol per-acilado são possíveis de observar sendo que alguns hidrogénios apresentam o mesmo valor de desvio devido à simetria da molécula.

Resultados e discussão

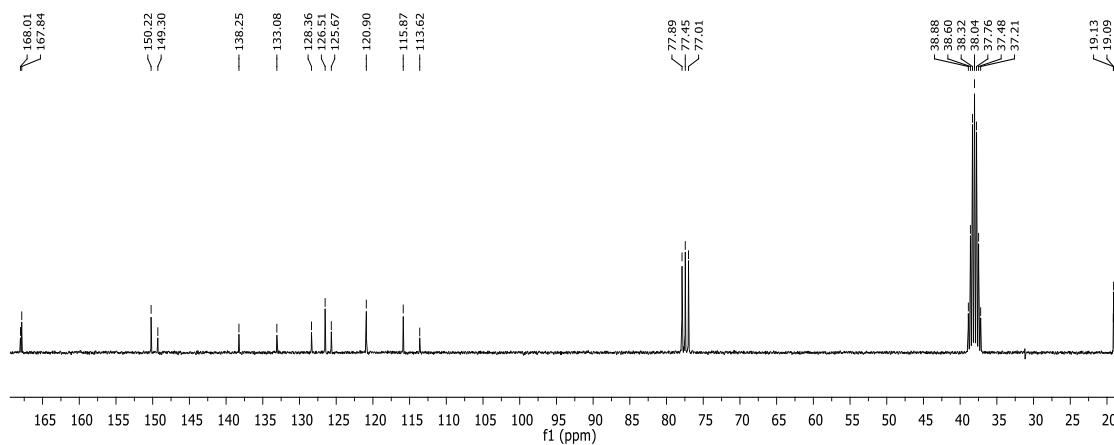


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C do produto da acilação química do resveratrol

A análise dos DEPT 90 e 135 (figuras 73 e 74) permitiu confirmar que os sinais a 167,84 ppm e 168,01 ppm são relativos aos carbonos quaternários e os sinais a 19,09 ppm e 19,13 ppm são relativos aos carbonos dos grupos metilo do acetato.

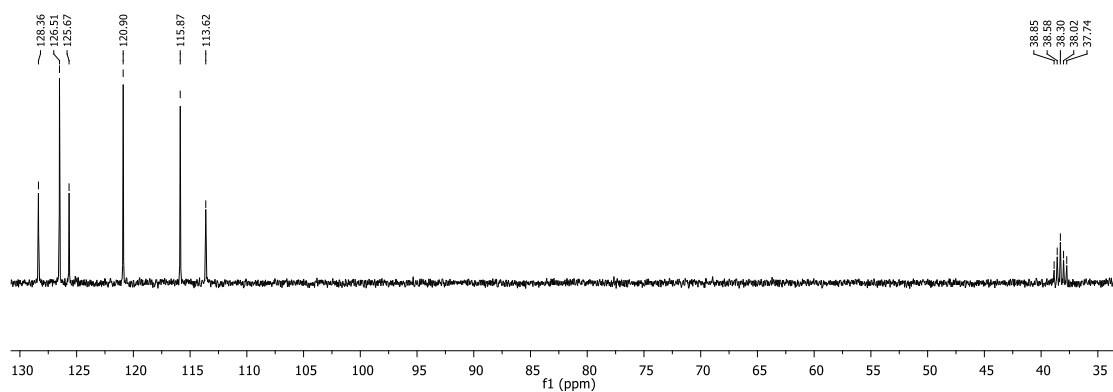


Figura 73. Espectro DEPT 90 do produto da acilação química do resveratrol

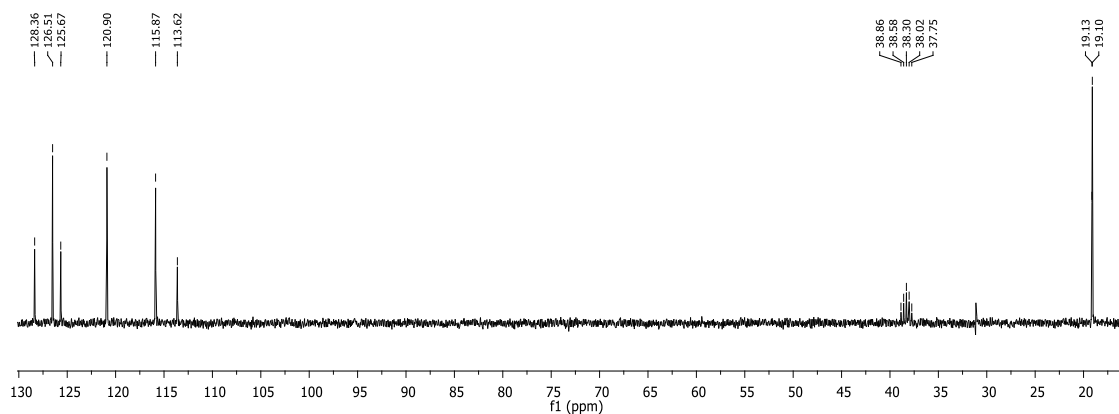


Figura 74. Espectro DEPT 135 do produto da acilação química do resveratrol

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135 permitem confirmar as posições de acilação.

Os dados de IV confirmam a presença do éster.

Uma vez esclarecida a estrutura do produto da reação, a representação esquemática da reação (figura 75) pode ser apresentada.

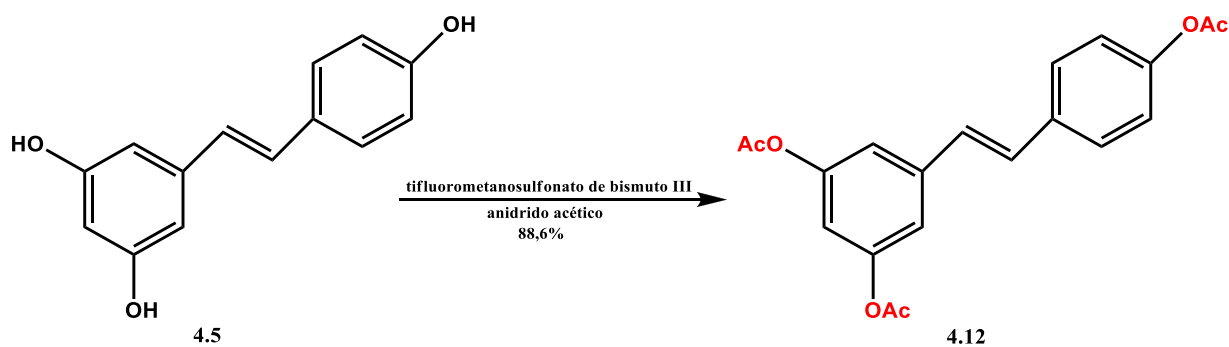


Figura 75. Representação esquemática da acilação química do resveratrol

3.3.2. Alcoólises enzimáticas

Alcoólise é uma reação de transesterificação, na qual um éster, o substrato per acilado, reage com um álcool formando-se outro éster e o álcool é o grupo abandonante. Esta reação pode ser vantajosamente usada em síntese orgânica uma vez que substratos não polares, tais como os esteres, são solúveis em meios orgânicos e nestes meios não convencionais as lipases ainda exibem um atividade.

3.3.2.1. Alcoólise enzimática da naringenina

Partindo da naringenina per-acilada procedeu-se ao *screening* de álcoois e enzimas usando heptano como solvente.

	Butanol	Octanol
CALB	-	+
PS	-	+

Tabela 5. Otimização das condições de reação para a alcoólise da naringenina

Da análise da tabela anterior concluiu-se que apenas ocorreu reação quando o álcool usado foi o octanol.

Assim, efetuaram-se reações em maior escala em heptano e octanol para ambas as enzimas, a 50°C e 200 rpm.

Verificou-se que as enzimas nestas condições não eram seletivas uma vez que o produto obtido era a própria naringenina.

Efetuuou-se um ensaio sem enzima das reações anteriores para averiguar a possibilidade da reação ocorrida ser química e não enzimática.

3.3.2.2. Alcoólise enzimática do resveratrol

Partindo do resveratrol per-acilado procedeu-se ao *screening* de enzimas e solventes usando butanol.

	Tolueno	Heptano	Acetona	Etilmetilcetona
CALB	-	+	-	-
PS	-	++	-	-

Tabela 6. Otimização das condições de reação para a alcoólise do resveratrol

Por observação da tabela verifica-se que apenas ocorreu reação em heptano.

Então, efetuou-se a reação em maior escala usando heptano como solvente para a lipase PS e butanol, a 50°C e 200 rpm.

A enzima não foi seletiva, obteve-se resveratrol.

Como o butanol inibe a enzima, efetuou-se a reação em maior escala usando heptano como solvente para a CALB e octanol a 50°C e 200 rpm.

Mais uma vez se verificou que a enzima não foi seletiva e obteve-se resveratrol.

Efetuoou-se um ensaio sem enzima das reações anteriores para averiguar a possibilidade da reação ocorrida ser química e não enzimática.

CAPITULO 4

CONCLUSÕES

4. Conclusões

Os compostos polifenólicos são encontrados em diversas fontes naturais e atualmente recebem muita atenção devido às suas propriedades biológicas relevantes.

A acilação enzimática deste tipo de compostos é um desafio interessante em termos do estudo da regioselectividade das enzimas.

As vantagens desta metodologia, tais como condições reacionais suaves, baixo impacto ambiental, torna as lipases uma ferramenta importante na aplicação dos princípios da Química Verde, oferecendo um caminho conveniente para preparar derivados de compostos polifenólicos com grande potencial na indústria farmacêutica.

Assim, compostos polifenólicos da classe dos flavonóides e dos estilbenos foram submetidos à ação de lipases em meio orgânico, usando acetato de vinilo, butirato de vinilo e decanoato de vinilo como agentes acilantes.

Os resultados obtidos mostram que as lipases são capazes de diferenciar diferentes grupos hidroxilo, permitindo obter os respectivos esteres com elevada regioselectividade e bons rendimentos.

A conhecida preferência da CALB pelo grupo hidroxilo na posição 4' foi verificada na acilação da naringenina com acetato de vinilo e do resveratrol com butirato de vinilo.

No entanto, na acilação do resveratrol com butirato de vinilo e lipase PS obteve-se um derivado diacilado nas posições 3 e 4'.

Conclusões

Adicionalmente, na acilação do resveratrol com acetato de vinilo, ambas as enzimas permitiram obter um derivado diacilado nas posições 3 e 4'.

A acilação do resveratrol com decanoato de vinilo também permitiu obter um derivado diacilado nas posições 3 e 4'.

De notar que apesar da semelhança estrutural dos grupos fenólicos da naringenina e do resveratrol, os resultados obtidos foram diferentes. A maior flexibilidade e a não existência da fusão dos anéis A e B permite que o resveratrol encaixe mais facilmente no local ativo da enzima.

A preferência da CALB para grupos hidroxilo primários, como o presente na posição C-6'' livre da glicose na molécula de naringina foi verificada.

No entanto, na reacção de acilação da naringina adicionalmente ao hidroxilo na posição C-6'' também foi acilado o hidroxilo da posição C-4'''.

Por outro lado, a crisina não foi aceite como substrato para nenhuma das enzimas.

Alem disso, a lipase CR não foi aceite pelo resveratrol.

As alcoólises da naringenina e do resveratrol per-acilados não foram seletivas nas condições em que se realizaram.

Assim, os resultados obtidos evidenciam as potencialidades da catálise enzimática na transformação regiosselectiva de compostos polifenólicos, com o intuito de melhorar as suas propriedades biológicas, nomeadamente a atividade antioxidante, e estão de acordo com a literatura.

De seguida o estudo das propriedades biológicas dos novos compostos e a análise de relações estrutura-atividade permitirão identificar as características estruturais necessárias a uma determinada atividade biológica e identificar novos compostos bioactivos.

CAPITULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5. Parte experimental

5.1. Instrumentação

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons, RMN ^1H , foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 500, a 500 MHz. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13, RMN ^{13}C , foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III de 400 Mz. A caracterização de carbonos metílicos, metilénicos e quaternários foi efetuada por DEPT. Os desvios químicos são dados na escala σ (ppm) e são relativos a uma mistura de clorofórmio deuterado e dimetilsulfóxido deuterado como solvente e TMS como padrão interno. Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro Jasco FT/R-420. Os pontos de fusão (pf) foram determinados num aparelho Büchi-540 e não foram corrigidos.

As reações enzimáticas foram efetuadas num agitador orbital New Brunswick Scientific, C24 Incubator Shaker, a 50°C e 200 rpm.

5.2. Cromatografia

A cromatografia em camada fina foi feita em placas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ Merk usando misturas de éter de petróleo / acetato de etilo, clorofórmio / acetona / ácido acético (60:35:5) ou clorofórmio / metanol (9,7:0,3) como eluentes.

5.3. Reagentes e solventes

Todos os compostos comercialmente disponíveis foram usados como fornecidos pelos fabricantes.

Crisina, naringenina, naringina, resveratrol, foram obtidos da TCI. Trifluorometanosulfonato de bismuto III, 4-dimetil-aminopiridina (4-DMAP), piridina, tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, acetato de vinilo, decanoato de vinilo, etilmetilcetona, acetonitrilo, diclorometano, butanol, octanol, hidróxido de sódio e anidrido acético foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. Tolueno, heptano, acetona, sulfato de sódio anidro, sílica gel 60 (cromatografia em coluna) e TLC sílica gel 60 F₂₅₄ foram obtidas da MERK Co.

As lipases foram fornecidas pela Sigma-Aldrich Co.

5.4. Acilações enzimáticas

Num ensaio de rastreio típico, uma solução de substrato (2mg) em solvente (0,9 ml) e agente acilante (0,1 ml) foi adicionada à enzima (5 mg) em frascos de 3 ml. Os frascos foram fechados e as suspensões foram agitadas a 200 rpm a 50°C. As reações foram monitorizadas por CCF durante 3 dias. Para cada substrato, selecionaram-se os melhores resultados para as reações maior escala.

5.4.1. Acilação enzimática da naringenina

4'-Acetato de naringenina, 4.2

A uma solução de naringenina (**4.1**, 70 mg; 0,29 mmol) em THF (3 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se lipase PS (80 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Após 3 dias adicionou-se mais enzima (40 mg) e agente acilante (0,1 ml) e manteve-se a agitação a 50°C. Ao fim de 6 dias verificou-se que o substrato praticamente não reagiu e abandonou-se a reação.

De acordo com o procedimento descrito por Chebil *et al.* (2007) a uma solução de naringenina (**4.1**, 50 mg; 0,18 mmol) em acetonitrilo (3 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se lipase PS (100 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Não se observou reação.

De acordo com o procedimento descrito por Kyriakou *et al.* (2012) a uma solução de naringenina (**4.1**, 50 mg; 0,18 mmol) em acetona (10 ml) e acetato de vinilo (5ml) foi adicionada CALB (500mg) e a mistura reacional foi agitada a 50°C. Ao fim de três adicionou-se CALB (100mg). Após quatro dias, a enzima foi filtrada e o solvente evaporado. O 4'-acetato de naringenina (**4.2**, 99,2 mg, 94,12%) foi isolado por cromatografia em coluna, éter de petróleo / acetato de etilo com gradiente de polaridade de 4:1 a 2:1.

P.f.: 151,8 – 152,1 °C

IV (ATR): ν_{\max} 838,883; 1224,58; 1459,85; 1594,84; 1629,55; 1752,98

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO) δ ppm: 2,12 (3H, 3s, CH₃ (OAc-4')); 2,66 (1H, dd, J= 3,10 Hz e 3,38 Hz, H-3_{cis}); 3,01 (1H, dd, J=12,96Hz, H-3_{trans}); 5,37 (1H, dd, J=2,92 Hz, H-2); 5,73 (2H, dd, J=2,06 Hz, H-6 e H-8); 7,01 (2H, d, J=8,93 Hz, H-3' e H-5'); 7,37 (2H, d, J=9,58 Hz, H-2' e H-6'); 10,51 (1H, s, H-7); 11,92 (1H, s, H-5)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 19,11 (CH₃ (OAc-4')); 40,74 (C-3); 93,79 (C-8); 94,82 (C-6); 100,56 (C-10); 120,74 (C-3' e C-5'); 126,59 (C-2' e C-6'); 135,11 (C-1'); 149,58 (C-4'); 161,74 (C-9); 162,78 (C-5); 156,96 (C-7); 168,05 (COMe); 194,78 (C-4)

5.4.2. Acilação enzimática da naringina

4''', 6'' -Diacetato de naringina, 4.4

A uma solução de naringina (**4.3**, 100 mg; 0,17 mmol) em acetona (6ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se Novozym 435 (100 mg) e a mistura reacional foi agitada a 50°C. Ao fim de 2 dias adicionou-se mais enzima (50 mg) e manteve-se a agitação a 50 °C. Após 6 dias, a reação estava completa. A enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por ultimo, o 4''', 6''-diacetato de naringina (**4.4**, 30,1 mg, 94,12 %) foi isolado por cromatografia em coluna, clorofórmio /acetona / metanol (60:35:5).

P.f.: 227,1-227,3°C

IV (ATR): ν_{\max} 827,312; 1243,86; 1643,05; 1714,41

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 1,04 (1H, d, J=5,89 Hz, H-6'''); 2,60 (1H, dd, J=2,60 Hz e 3,47 Hz, H-3_{cis}); 3,08 (1H, m, H-3_{trans}); 3,35-5,30 (H's do açúcar); 5,53 (1H, d, J=2,77 Hz, H-2); 5,93 (2H, d, J=4,30 Hz, H-6 e H-8); 6,65 (2H, d, J=8,60 Hz, H-3' e H-5'); 7,13 (2H, d, J=9,09 Hz, H-2' e H-6'); 9,33 (1H, s, H-4'); 11,87 (1H, s, H-5)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 15,21 e 18,20 e 18,56 (cada 3 H, 3 s, (CH₃-(C-6')), (CH₃ (OAc-4')), (CH₃ (OAc-6'''))); 39,96 (C-3); 76,99 (C-2); 93,39 (C-8); 94,51 (C-6); 95,83 (C-1''); 98,02 (C-1'''); 100,70 (C-10); 113,44 (C-3' e C-5'); 126,66 (C-2' e C-6'); 127,46 (C-1'); 156,43 (C-4'); 161,44 (C-9); 161,60 (C-5); 163,16 (C-7); 168,44 e 168,66 (COMe); 195,98 (C-4)

5.4.3. Acilação enzimática do resveratrol

3,4'-Diacetato de resveratrol, 4.6

A uma solução de resveratrol (**4.5**, 50 mg; 0,22 mmol) em tolueno (3 ml) e acetato de vinilo (0,5 ml), adicionou-se Novozym 435 (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Após 3 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se a agitação a 50°C. Ao fim de 6 dias a enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por fim, o 3,4'-diacetato de resveratrol (**4.6**, 15,3 mg, 22,27 %) foi isolado por cromatografia em coluna, éter de petróleo / acetato de etilo com gradiente de polaridade de 4:1 a 2:1.

P.f.: 250,5- 251,1 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 2,10 e 2,11 (cada 3H, 2 s, CH₃ (3-OAc) e CH₃ (4'-OAc)); 6,27 (1H, t, J = 2,18 Hz, H-4); 6,62 (1H, s, H-2); 6,68 (1H, s, H-6); 6,88 (1H, s, H-7); 6,96 (2H, d, J = 7,16 Hz, H-3' e H-5'); 7,01 (1H, s, H-8); 7,42 (2H, d, J = 8,56 Hz, H-2' e H-6'); 9,52 (1H, s, H-5)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 19,14 e 19,17 (CH₃ (3-OAc) e CH₃ (4'-OAc)); 107,25 (C-4); 108,96 (C-2); 109,90 (C-6); 120,85 (C-3' e C-5'); 126,36 (C-7); 126,84 (C-2' e C-6'); 127,05 (C-8); 133,038 (C-1'); 137,90 (C-1); 149,07 (C-4'); 150,72 (C-3); 157,50 (C-5); 168,00 e 168,08 (COMe)

3,4'-Diacetato de resveratrol, 4.7

A uma solução de resveratrol (**4.5**, 50 mg; 0,22 mmol) em tolueno (3 ml) e acetato de vinilo (0,5 ml), adicionou-se lipase PS (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Após 3 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se e a agitação a 50°C. Ao fim de 6 dias a enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por fim, o 3,4'-diacetato de resveratrol (**4.7**, 38 mg, 54,55 %) foi isolado por cromatografia em coluna, éter de petróleo / acetato de etilo com gradiente de polaridade de 4:1 a 2:1.

P.f.: 250,6-250,9 °C

IV (ATR): ν_{\max} 898,666; 1238,08; 1714,41; 1762,62; 2300,66; 3276,47

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 2,10 e 2,11 (cada 3H, 2 s, CH_3 (3-OAc) e CH_3 (4'-OAc)); 6,27 (1H, t, $J = 1,93$ Hz, H-4); 6,61 (1H, s, H-2); 6,68 (1H, s, H-6); 6,87 (1H, s, H-7); 6,95 (2H, d, $J = 8,55$ Hz, H-3' e H-5'); 7,00 (1H, s, H-8); 7,41 (2H, d, $J = 8,55$ Hz, H-2' e H-6'); 9,50 (1H, s, H-5)

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 19,16 (CH_3 (3-OAc) e CH_3 (4'-OAc)); 107,24 (C-4); 108,95 (C-2); 109,87 (C-6); 120,83 (C-3' e C-5'); 126,34 (C-2' e C-6'); 126,83 (C-7); 127,03 (C-8); 133,36 (C-1'); 137,87 (C-1); 149,06 (C-4'); 150,71 (C-3); 157,49 (C-5); 167,98 e 168,05 (COMe)

4'-Butirato de resveratrol, 4.8

A uma solução de resveratrol (**4.5**, 50 mg; 0,22 mmol) em tolueno (3 ml) e butirato de vinilo (0.5 ml), adicionou-se CALB (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Após 3 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se e a agitação a 50°C. Ao fim de 6 dias a enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por fim, o 4'-butirato de resveratrol (**4.8**, 37,7 mg, 63,64 %) foi isolado por cromatografia em coluna, éter de petróleo / acetato de etilo com gradiente de polaridade de 4:1 a 2:1.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 0,84 (3H, t, J = 7,53 Hz e 7,22 Hz, CH₃ (4'-OAc)); 1,08 e 1,56 (4H, m, CH₂ (4'-OAc)); 6,01 (1H, t, J = 2,01 Hz e 2,28 Hz, H-4); 6,26 (2H, d, J = 2,28 Hz, H-2 e H-6); 6,82 (2H, d, J = 2,55, H-3' e H-5'); 6,89 (1H, s, H-7); 6,92 (1H, s, H-8); 7,39 (2H, d, J = 8,61 Hz, H-2' e H-6'); 8,97 (2H, s, H-3 e H-5)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 11,62 (CH₃ (4'-OAc)); 16,16 (CH₂ (4'-OAc)); 33,83 (CH₂ (4'-OAc)); 101,39 (C-4); 103,46 (C-2 e C-6); 120,75 (C-3' e C-5'); 125,66 (C-7); 126,15 (C-2' e C-6'); 128,03 (C-8); 133,63 (C-1'); 137,49 (C-1); 148,81 (C-4'); 157,67 (C-3 e C-5); 170,64 (COMe)

3,4'-Dibutirato de resveratrol, 4.9

A uma solução de resveratrol (**4.5**, 50mg; 0,22 mmol) em tolueno (3 ml) e butirato de vinilo (0,5 ml), adicionou-se lipase PS (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Após 3 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se e a agitação a 50°C. Após 7 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se e a agitação a 50°C. Ao fim de 9 dias a enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por fim, o 3,4'-dibutirato de resveratrol (**4.9**, 14,8 mg, 21,36 %) foi isolado por cromatografia em coluna, éter de petróleo / acetato de etilo com gradiente de polaridade de 4:1 a 3:1.

Parte experimental

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 0,85 (6H, m, CH₃ (3-OAc) e CH₃ (4'-OAc)); 1,56 (8H, m, CH₂ (3-OAc) e CH₂ (4'-OAc)); 6,25 (1H, t, J = 1,89 Hz e 2,01 Hz, H-4); 6,60 (1H, s, H-2); 6,68 (1H, s, H-6); 6,91 (1H, s, H-7); 6,94 (2H, d, J = 1,54 Hz, CH-3' e CH-5'); 6,96 (1H, s, H-8); 7,42 (2H, d, J = 8,87 Hz, CH-2' e H-6'); 9,50 (1H, s, H-5)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 11,65 (CH₃ (3-OAc) e CH₃ (4'-OAc)); 16,16 e 16,20 (CH₂); 33,90 (CH₂); 107,23 (C-2); 108,97 (C-2); 109,82 (C-6); 120,83 (C-3' e C-5'); 126,36 (C-7); 126,83 (C-2' e C-6'); 127,04 (C-8); 133,35 (C-1'); 137,90 (C-1); 149,06 (C-4'); 150,72 (C-3); 157,50 (C-5); 170,56 e 170,64 (COMe)

3,4'-Didecanoato de resveratrol, **4.10**

A uma solução de resveratrol (**4.5**, 50mg; 0,22 mmol) em tolueno (3 ml) e decanoato de vinilo (0,5 ml), adicionou-se CALB (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C. Após 3 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se e a agitação a 50°C. Após 6 dias adicionou-se mais enzima (30 mg) e manteve-se e a agitação a 50°C. Ao fim de 10 dias a enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por fim, o 3,4'-didecanoato de resveratrol (**4.10**, 71,3 mg, 86,36 %) foi isolado por cromatografia em coluna, éter de petróleo / acetato de etilo com gradiente de polaridade de 6:1 a 2:1.

P.f.: 66,5-67,5 °C

IV (ATR): ν_{\max} 931,45; 1295,93; 1465,63; 1695,12

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 0,26-1,52 ($(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)₂; 5,42 (1H, t, H-4); 5,78 (1H, s, H-2); 5,85 (1H, s, H-6); 6,09 (1H, d, $J=15,10$ Hz, H-7); 6,11 (2H, d, $J=8,42$ Hz, H-3' e H-5'); 6,15 (1H, d, $J=16,22$, H-8); 6,61 (2H, d, $J=8,30$ Hz, H-2' e H-6'), 10,89 (1H, s, H-5)

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 11,60-31,49 ($(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)₂; 106,63 (C-4); 108,41 (C-2); 109,26 (C-6); 120,28 (C-3' e C-5'); 125,85 (C-2' e C-6'); 126,27 (C-7); 126,52 (C-8); 132,81 (C-1'); 137,40 (C-1); 148,51 (C-4'); 150,17 (C-3); 156,91 (C-5); 170,17 e 170,26 (COMe)

5.5. Acilações químicas

5.5.1. Síntese da naringenina per-acilada

4',5,7-Triacetato de naringenina, 4.11

A naringenina (**4.1**, 200 mg; 0,74 mmol) foi dissolvida em diclorometano (4 ml) e piridina (1 ml) e adicionou-se anidrido acético (0,6 ml) e 4-DMAP. A reação foi deixada com agitação à temperatura ambiente. Ao fim de 2 h, a fase orgânica foi lavada com uma solução de HCl a 5%, uma solução de NaOH concentrada, água e NaCl concentrado. Após secagem com sulfato de sódio anidro a fase orgânica foi filtrada e evaporada, obtendo-se o 4',5,7-triacetato de naringenina (**4.11**; 99,2 mg; 95,5 %, pó amarelo).

P.f.: 89,4 – 89,7 °C

IV (ATR): ν_{\max} 1639,19; 1612,2; 852,382

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆) δ ppm: 2,12 (6H, s, CH₃ (OAc-3) e CH₃ (OAc-5)); e 2,15 (3H, s, CH₃ (OAc-4')); 2,58 (1H, d, J = 2,46Hz, H-3_{cis}); 2,63 (1H, d, J = 2,97 Hz, H-3_{trans}); 5,49 (1H, dd, J = 2,73 Hz, H-2); 6,46 (1H, d, J = 2,64 Hz, H-8); 6,66 (1H, d, J = 2,34 Hz, H-6); 7,01 (2H, J = 8,44 Hz, H-3' e H-5'); 7,40 (2H, d, J = 8,24 Hz, H-2' e H-6')

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 19,06 e 19,11 e 19,15 (CH_3 (OAc-4') e CH_3 (OAc-5), CH_3 (OAc-7)); 42,24 (C-3); 107,84 (C-8); 109,45 (C-6); 110,33 (C-10); 120,79 (C-3' e C-5'); 134,65 (C-1); 149,72 (C-4'); 149,83 (C-9); 154,70 (C-5); 161,86 (C-7); 167,11 e 167,61 e 168,06 (C=O) e 188,08 (C-4)

5.5.2. Síntese do resveratrol per-acilado

3,5,4'-Triacetato de resveratrol, 4.12

De acordo com o descrito por Chakraborti *et al.* (2003), resveratrol (**4.5**, 100 mg; 0,44 mmol) e trifluorometanosulfonato de bismuto III (58 mg, 0,09 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (5 ml) e adicionou-se anidrido acético (1 ml). A reação foi deixada durante 24 h com agitação à temperatura ambiente. Então, adicionou-se etanol e a mistura foi extraída com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO_3 com água e com uma solução saturada de NaCl , seca com sulfato de sódio anidro e finalmente evaporada. Após evaporação obteve-se 3,5,4'-triacetato de resveratrol (**4.12**, 138,8 mg, 88,6 %, pó acastanhado).

P.f.: 112,6 – 112,9 °C

IV (ATR): ν_{\max} 667,25; 906,379; 966,162; 1754,9

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 1,90 (3H, s, CH_3 (OAc-4')); 1,91 (6H, s, CH_3 (OAc-3) e CH_3 (OAc-4')); 6,47 (1H, t, $J = 2,19$ Hz, H-4); 6,75 (2H, d, $J = 8,52$ Hz, H-2 e H-6); 6,80 (1H, s; H-7); 6,86 (2H, d, $J = 1,94$ Hz, H-3' e H-5'); 6,92 (1H, s, H-8); 7,21 (2H, d, $J = 8,52$ Hz, H-2' e H-6')

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$) δ ppm: 19,09 e 19,13 (CH_3 (OAc-3), (CH_3 (OAc-5) e (CH_3 (OAc-4')); 113,62 (C-4); 115,87 (C-2 e C-6); 120,90 (C-3' e C-5'); 125,67 (C-7); 126,51 (C-2' e C-6'); 128,36 (C-8); 133,08 (C-1'); 138,25 (C-1); 149,30 (C-4'); 150,22 (C-3 e C-5); 167,84 e 168,01 (COMe)

5.6. Alcoólises enzimáticas

Num ensaio de rastreio representativo, a naringina e o resveratrol per-acilados (2mg) em solvente (0,9 ml) e butanol ou octanol (0,1 ml) foram adicionados à enzima (5 mg) em frascos de 3 ml. Os frascos foram fechados e as suspensões foram agitadas a 200 rpm a 50°C. As reações foram monitorizadas por CCF durante 3 dias. Para cada substrato, selecionaram-se os melhores resultados para as reações maior escala.

5.6.1. Alcoólise enzimática da naringenina

A uma solução de naringenina per-acilada (**4.11**, 50mg; 0,13 mmol) em heptano (5 ml) e octanol (0,5 ml), adicionou-se Novozym 435 (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C.

A uma solução de naringenina per-acilada (**4.11**, 50mg; 0,13 mmol) em heptano (5 ml) e octanol (0,5 ml), foi adicionada lipase PS (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C.

5.6.2. Alcoólise enzimática do resveratrol

A uma solução de resveratrol per-acilado (**4.12**, 50mg; 0,14 mmol) em heptano (3 ml) e butanol (0,5 ml), a lipase PS foi adicionada (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C.

A uma solução de resveratrol per-acilado (**4.12**, 50mg; 0,14 mmol) em heptano (3 ml) e octanol (0,5 ml), adicionou-se Novozym 435 (50 mg) e a reação foi agitada a 50°C.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

- Aggarwal, B.; Bhardwaj, A.; Aggarwal, R. S.; Seeram, N. P.; Shishodia, S., & Takada, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, **2004**, 24 (5A), 2783–2840.
- Alfonso, I.; Gotor, V. Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 201-209.
- Andrus, M. B.; Liu, J. Synthesis of polyhydroxylated ester analogs of the stilbene resveratrol using decarbonylative Heck couplings. *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 5811-5814.
- Aquilano, K.; Baldelli, S.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. Role of nitric oxide synthase in Parkinson's disease: A review on the oxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem. Res.*, **2008**, 33, 2416-2426.
- Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Engasser, J-M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004a**, 29, 63–67.
- Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Ognier, S.; Engasser, JM.; Moussou, P.; Pauly, G. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J. Biotechnol.*, **2004b**, 110, 265–272.
- Ardhaoui, M.; Falcimaigne A.; Engasser JM.; Moussou P.; Pauly G.; Ghoul M. Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. *Biocatal. Biotransformation*, **2004c**, 253–259.
- Arichi, H., Kimura, Y., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, M., & Arichi, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc. on lipid metabolism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1982**, 30 (5), 1766–1770.
- Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., et al. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2007**, 224 (3), 274–283.
- Balasundram, N.; Sundram, K; Samman, S. Phenolic compound in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **2006**, 99, 191-203.
- Barbayianni, E.; Kokotos, G. Biocatalyzed Regio- and Chemoselective Ester Cleavage: Synthesis of Bioactive Molecules. *ChemCatChem*, **2012**, 4, 592-608.

Bibliografia

- Baur, J. A.; Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Natural reviews*, **2006**, 5, 493-506.
- Benavente-García, O.; Castillo, J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 6185-6205.
- Bertelli, A. A. E., Giovannini, L., Giannessi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M., et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal of Tissue Reactions*, **1995**, 17 (1), 1-3.
- Bishayee, A. Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. *Cancer Prev. Res.*, **2009**, 2, 409-418.
- Boyce, S.; Tripton, K. F. Enzyme Classification and Nomenclature. *Encyclopedia of Life Sciences*, **2001**.
- Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Introduction to biocatalysis. *In Biocatalysis. Fundamentals and Applications*, **2004a**, Wiley-VCH, 1-18.
- Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Nucleophile catalysis. *In Biocatalysis. Fundamentals and Applications*. **2004b**, Wiley-VCH, 261-268.
- Borriello, A.; Cucciolla, V.; Della Ragione, F.; Galletti, P. Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of homeostasis *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **2010**, 20, 618-625.
- Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derwenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenbug, J. P.; Christiansen, L.; Højbjerg, B.; Thim, L.; Menge, U. A serine protease triad forms the catalytic center of triacylglycerol lipases. *Nature*, **1990**, 343 (6260), 767-770.
- Bagli, E.; Stefanidou, M.; Morbidelli, L.; Ziche, M.; Psillas, K.; Murphy, C.; Fotsis, T. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; Inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7936-7946.
- Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **1998**, 56:317-333.
- Brownson, D.M.; Aziz, N.G.; Fuqua, B.K.; Dharmawardhane, S.F.; Mabry, T.J. Flavonoids effects relevant to cancer. *J. Nutr.*, **2002**, 132, 2482-2489.
- Cais, H. J.; Theil, F. Hydrolysis and formation of C-O bonds. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; Eds. K. Drauz and H. Waldmann, *Wiley-VCH*, **2002**, 335-578.
- Carrea, G.; Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2226-2254.

- Casagrande, F.; Darbon, J. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, 61, 1205–1215.
- Castillo-Pichardo, L.; Martínez-Montemayor, M. M.; Martínez, J. E.; Wall, K.; Cubano, L. A.; Dharmawardhane, S. Inhibition of mammary tumor growth and metastases to bone and liver by dietary grape polyphenols. *Clin. Experiment. Metas.*, **2009**, 26, 505-516.
- Céliz, G.; Daz, M. Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside pruning in organic media. *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 94-100.
- Chakraborti, A. K.; Gulhane, R.; Shivani Bismuth Oxide Perchlorate as a Highly Efficient Catalyst for Heteroatom Acylation Under Solvent-Free Conditions. *Synlett*, **2003**, 1805-1808.
- Chamouleau, F.; Coulon, D.; Girardin, M.; Ghoul, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, 11, 949 – 954.
- Chebil, L.; Anthoni, J.; Humeau, C.; Gerardin, C.; Engasser, J.; Ghoul, M. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 2237-2251.
- Chebil, L.; Anthoni, J.; Humeau, C.; Gerardin, C.; Engasser, J.; Ghoul, M. Enzymatic acylation of flavonoids: effect of the natures of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 9496-9502.
- Commenges, D.; Scotet, V.; Renaud, S.; Jacqmin-Gadda, H.; Barberger- Gateau, P.; Dartigues, J.F. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.*, **2000**, 16, 357-363.
- Croft, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**, 854, 435–442.
- Cruz Silva, M. M.; Carvalho, J. F.; Riva, S.; Sá Melo, M. L. Biocatalytic Transformations of Steroids: Focus on Hydrolase-Catalyzed Reactions. *Current Organic Chemistry*, **2011**, 15.
- Dangles, O.; Dufour, C. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. *New York*, **2006**, 443-469.
- D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovanni, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità*, **2007**, 43 (4), 348-361.
- Das, M.; Das, D. K. Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular Aspects on Medicine*, **2010**, 31, 503-512.
- Degenhardt, A.; Ullrich, F.; Hofmann, T. & Stark, T. Flavonoid sugar additionproducts, method for manufacture and use thereof. Patent US 20070269570, **2007**.

Bibliografia

- Depeint, F.; Gee, J.M.; Williamson, G.; Johnson, I.T. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.*, **2002**, 61, 97-103.
- Dehkharghanian, M., Lacroix, M., and Vijayalakshmi, M. A. Antioxidant properties of green tea polyphenols encapsulated in caseinate beads. *Dairy Sci. Technol.*, **2009**, 69, 485–499.
- Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, **2006**, 17, 505–512.
- Dong, W., Li, N., Gao, D., Zhen, H., Zhang, X., & Li, F. Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein express for angiogenic factors. *Journal of Vascular Surgery*, **2008**, 48 (3), 709–714.
- El Gharras, H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, **2009**, 44, 2512-2518.
- Elmali N, Esenkaya I, Harma A, Ertem K, Turkoz Y, Mizrak B. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflamm. Res.*, **2005**, 54 (4), 158–62.
- Enaud, E.; Humeau, C.; Piffaut, B.; Girardin, M. Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 27, 1–6.
- Engelhart, M.J.; Geerlings, M.I.; Ruitenber, A.; Van Swieten, J.C.; Hofman, A.; Witteman, J.C.M.; Breteler, M.M.B. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, **2002**, 287, 3223-3229.
- Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry. *Springer-Verlag, Heidelberg*, **2004**.
- Fernández-Mar, M.I.; Mateos, R.; García-Parrilla, M.C.; Puertas, B.; Cantos-Villar, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review, *Food Chemistry*. **2012**, 130, 797-813.
- Figueroa-Espinoza, M.-C.; Villeneuve, P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2779-2787.
- Floreani, M., Napoli, E., Quintieri, L., & Palatini, P. Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Sciences*, **2003**, 72 (24), 2741–2750.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., & Kinsella, J. E. Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **1993**, 341 (8843), 454–457.
- Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I.; Fraga, C. G. Antioxidants actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2010**, 501, 23-30.

- García-Junceda, E; García-García, J. F.; Bastida, A.; Fernández-Mayoralas, A. Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 1817-1834.
- Gao, C., Mayon, O.; MacManus DA.; Vulfson E. N. Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 71, 235–243.
- Garvin, S., Ollinger, K., & Dabrosin, C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Letters*, **2006**, 231 (1), 113–122.
- Gayot, S., Santarelli, X.; Coulon D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *J. Biotechnol.*, **2003**, 101, 29–36.
- Gazak, R; Marhol, P.; Purchartová, K.; Monti, D.; Biedermann, D.; Riva, S.; Cvak, L.; Kren, V. Large-scale separation of silybin diastereoisomers using lipases. *Process. Biochem.*, **2010**, 45, 1657-1663.
- Ghoul, M.; Engasser, J.-M.; P.; Pauly, G.; Ardhaoui, M. & Falcimaigne, A Enzymatic production of acyl flavonoid derivatives. Patent US 20060115880, **2006**.
- Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for preparation of pharmaceuticals. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 1-10.
- Gülçin, İlhami Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **2010**, 11, 210-218.
- Gutierrez-Merino, C.; Lopez-Sanches, C.; Lagoa, R.; Samhan-Arias, A.K.; Bueno, C.; Garcia-Martinez, V. Neuroprotective Actions of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, 18, 1195-1212.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. In *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press: Oxford, **1998**.
- Hao, H. D., & He, L. R. Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol. *Journal of Medicinal Food*, **2004**, 7 (3), 290–298.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 481-504.
- Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, **2008**, 7 (8), 1020–1035.
- Hari Krishna, S. Developments and trends in enzyme catalysis in non conventional media. *Biotech. Adv.*, **2002**, 20, 239-267.
- Hedfors, C., Hult, K., Martinelle, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 66, 120.
- Hedstrom, L., Enzyme Specificity and Selectivity. *Encyclopedia of Life Sciences*, **2001**, 1-7.

Bibliografia

- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, 572-584.
- Hidalgo, A., Bornscheuer, U.T. Direct evolution of lipases and esterases for organic synthesis, 1st ed. New York, CRC Press, Taylor and Francis, **2006**.
- Holvoet, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiologica*, **2004**, 59 (5), 479-484.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, **2003**, 425 (6954), 191-196.
- Hsieh, Tze-vchen; Wu, J. M. Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, **2010**, 36, 360-369.
- Huh, W., Yokoigawa, K., Esaki N., Soda, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56, 2081.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, **2011**, 1821-1835.
- Ishihara, k.; Nishimura, Y.; Kubo, T.; Okada, C.; Hamada, H.; Nakajima, N., *Plant Biotechnol.*, **2002**, 19, 211-214.
- Ishihara, k.; Nakajima, N. Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2003**, 23, 411-417.
- Jäger, A. K.; Saaby, L. Flavonoids and the CNS, *Molecules*, **2011**, 16, 1471-1485.
- Jain, N., Kumar, A.; Chauhan, S., Chauhan, S. M. S. Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1015-1060.
- Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Bleicher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Metha, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **1997**, 275, 218-220.
- Jarstoff, B.; Störmann, R.; Ranke, J.; Mölter, K.; Stock, F.; Oberheitmann, B.; Hoffmann, J.; Nüchter, M.; Ondruschka, B.; Filser, J., *Green Chem.*, **2003**, 5, 136-142.
- Jendekova, L.; Kojsova, S.; Andriantsitohaina, R.; Pechanova, O. The time-dependent effects of Provinols on brain NO synthase activity in L-NAME-induced hypertension. *Physiol. Res.* **2006**, 55, 31-37.
- Karlsson, J., Emgard, M., Brundin, P., & Burkitt, M. J. Trans-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide: Electron paramagnetic resonance spin

- trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *Journal of Neurochemistry*, **2000**, 75 (1), 141–150.
- 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. *J. Biotechnol.*, **2006**, 123, 491–503.
- Katsoura, M. H., Polydera, AC.; Katapodis, P.; Kolisis, FN.; Stamatis, H. Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochem.*, **2007**, 42, 1326–1334.
- Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **1999**, 63, 896–899.
- Kim, H. P.; Mani, I.; Iversen, L.; Ziboh, V. A. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **1998**, 58, 17-24.
- King, R. E.; Bomser, Joshua A.; Min; D. B. Bioactivity of Resveratrol, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2006**, 5, 65-70.
- Kontogianni, A.; Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H.; Kolisis, F. N. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur. J. Lip. Sci. Technol.*, **2001**, 103, 655–660.
- Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H.; Kolisis, F. N. Lipase catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2003**, 21, 59–62.
- Kuo, C. H.; Hsiao, F. W.; Dai, S. M.; Chang, C. M. J.; Lee, C. C.; Liu, Y. C.; Shieh, C. J. Lipase catalyzed acetylation of 3,5,4'-trihydroxystilbene: optimization and kinetic study. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2012**, 35, 1137-1145.
- 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. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 1739-1742.
- Lambusta, D.; Nicolosi, G.; Patti, A.; Sanfilippo, C. Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds, *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic* 22, **2003**, 271-277.
- La Vecchia, C., & Bosetti, C. Diet and cancer risk in Mediterranean countries: open issues. *Public Health Nutrition*, **2006**, 9 (8A), 1077–1082.

Bibliografia

- Letenneur, L.; Proust-Lima, C.; Le Gouge, A.; Dartigues, J.F.; Barberger- Gateau, P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am. J. Epidemiol.*, **2007**, *165*, 1364-1371.
- Li, Y., Cao, Z., & Zhu, H. Up-regulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacological Research*, **2006**, *53* (1), 6–15.
- Li, H. F., Chen, S. A., & Wu, S. N. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*, **2000**, *45* (4), 1035–1045.
- Lin, J-K; Weng, M-S. Flavonoids as nutraceuticals. *Grotewold E (ed.) The science of flavonoids, 1st ed. New York*, **2006**, 213-238.
- Linsalata, M.; Russo, F. Nutritional factors and polyamine metabolis in colorectal cancer. *Nutrition*, **2008**, *24*, 382-389.
- Lu, C.; Guo, Y.; Li, J.; Liao, M.; Xie, Z.; Li, X. Design, synthesis, and evaluation of resveratrol derivatives as A β ₁₋₄₂ aggregation inhibitors, antioxidants, and neuroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2012**, *22*, 7683-7687.
- Manach, C.; Scalbert A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, *79*, 727-747.
- Manthey, J. A.; Guthrie, N. Antiproliferative activities of *Citrus* flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 5837–5843.
- Martini, N. D.; Katarere, D. R. P; Eloff, J. N. Biological activity of five bacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, *93*, 207-212.
- Mayr, G. W.; Windhorst, S.; Hillemeier, K. Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1, 4, 5-triphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 13229–13240.
- Mbatia, B.; Kaki, S. S.; Mattiasson, Bo; Mulaa, F.; Adlercreutz, P. Enzymatic Synthesis os Lipophilic Rutin and Vanillyl Esters from Fish Byproducts. *J. of Agric. and Food Chem.*, **2011**, *59*, 7021-7027.
- Medina, I.; Alcántara, D.; González, M. J.; Torres, P.; Lucas, R.; Roque, J.; Plou, F. J.; Morales, J. C. Antioxidant Activity of Resveratrol in Several Fish Lipid Matrices: Effect of Acylation and Glucosylation. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 9778-9786.
- Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A. D., Kolisis, F. N., Stamatis, H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J Biotechnol*, **2005**, *116*, 295–304.

- Mellou, F.; Loutrari, H.; Stamatis, H.; Roussos, C.; Kolisis, FN. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochem.*, **2006**, 41, 2029-2034.
- Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian Cells: Implications for Inflammation. Heart Disease, and Cancer, *Pharmacol. Rev.*, **2000**, 52, 673-751.
- Monterde, M.; Brieva, R.; Gotor, V. Enzymatic resolution of the chiral auxiliary 2-methoxy-2-phenylethanol. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, 13, 1091-1096.
- Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; Ramachandran, V. N.; Ward, O. P.; Nigam, P. Understanding lipase stereoselectivity. *World J. Microbiol. Biotech.*, **2002**, 18, 81-87.
- Naczki, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41, 1523-1542.
- Nakajima, N.; Ishihara, K.; Itoh, T.; Furuya, T.; Hamada, H. Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J. Biosci. Bioeng.*, **1999**, 87, 105–107.
- Nakajima, N.; Ishihara, K.; Hamada, H.; Kawabe, S-I; Furuya, T. Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of Ipomoea batatas. *J. Biosci. Bioeng.*, **2000**, 90, 347–349.
- Narayana, K. R.; Reddy, M. S.; Chaluvadi, M. R.; Krishna, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*, **2001**, 33, 2-16.
- Nazir, N.; Koul, S.; Koul; Mushtaq, Qurishi, M.A.; Najar, M. H.; Zagar, M. I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. *Eur. J. of Med. Chem.*, **2011**, 46, 2415-2420.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Grothaus, P. G. Impact of natural Products on developing New Anti Cancer Agents. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 3012-3043.
- Nichols, J. A. and Katiyar, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.*, **2010**, 302, 71–83.
- Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J. M., Gómez, E., & Fernández, P. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, **2002**, 61 (2), 294–302.

Bibliografia

- Parker, J. A., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H., et al. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature Genetics*, **2005**, 37 (4), 349–350.
- Passicos, E.; Santarelli, X.; Coulon, D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnol. Lett.*, **2004**, 26, 1073-1076.
- Patel, R. N. Biocatalysis: Synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Curr. Org. Chem.*, **2006**, 10, 1289-1321.
- Pietta, Pier-Giorgio Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1035-1042.
- Plou, F. J.; Cruces, M. A.; Ferrer, M.; Fuentes, G., Pastor E.; Bernabe, M. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J. Biotechnol.*, **2002**, 96, 55-66.
- Praticò, D.; Delanty, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: Focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.*, **2000**, 109, 577-585.
- Prior R. L, Cao G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Hortic. Sci.*, **2000**, 35, 588–92.
- Procházková, D.; Bousová, I.; Wilhemová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, **2011**, 80, 513-523.
- Proestos, C.; Boziaris, I. S.; Nychas, G-JE.; Komaitis, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic palnts: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.*, **2006**, 95, 664-671.
- Provinciali, M., Re, F., Donnini, A., Orlando, F., Bartozzi, B., Di Stasio, G., et al. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumours in HER-2/neu transgenic mice. *International Journal of Cancer*, **2005**, 115 (1), 36–45.
- Purchartová, K.; Marhol, P.; Gazák, R.; Monti, D., Riva, S.; Kuzma, M.; Kren, V. Regioselective alcoholysis of silybin A and B acetates with lipases. *Journal of Molecular Catalysis B*, **2011**, 71, 119-123.
- Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységú, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 586-621.
- Ramassamy, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.*, **2006**, 545, 51-64.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, 95, 933-956.

- Riva S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2002**, 43-54.
- Robert, L.; Godeau, G.; Gavignet-Jeannin, C.; Groult, N.; Six, C.; Robert, AM. The effect of procyanidolic oligomers on vascular permeability. A study using quantitative morphology. *Pathol Biol (Paris)*, **1990**, 38, 608-616.
- Ross, J. A. and Kasum, C. M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.*, **2002**, 22, 19-24.
- Ruan, B. F.; Lu, X.; Tang, J. F.; Wei, Y.; Wang, X. L.; Zhang, Y.; Wang, L. S.; Zhu, H. L. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of resveratrol derivatives possessing chalcone moiety as potential antitubulin agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 2688-2695.
- Ruan, B. F.; Lu, X.; li, T. T.; Tang, J. F.; Wei, Y.; Wang, X. L.; Zheng, S. L., Yao, R. S.; Zhu, H. L. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of resveratrol derivatives possessing curcumin moiety as potential antitubulin agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 1113-1121.
- Rubin-Pitel, S. B.; Zhao, H. Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **2006**, 9, 247-257.
- Salem, J. H.; Chevalot, I. ; Harscoat-Schiavo, C.; Paris, C.; Fick, M.; Humeau, C. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. And their acylated derivatives. *Food Chemistry*, **2011**, 124, 486-494.
- Santaniello, E.; Casati, S.; Ciuffreda, P., Lipase Catalyzed deacylation by Alcoholysis: A Selective, Useful Transesterification Reaction. *Current Organic Chemistry*, **2006**, 10, 1095-1123.
- Scalbert, A.; Johnson, I. T; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81, 215-217.
- Schneider, Y., Duranton, B., Gosse, F., Schleiffer, R., Seiler, N., & Raul, F. Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis. *Nutrition and Cancer*, **2001**, 39 (1), 102-107.
- Shahidi, F.; Zhong, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2010**, 112, 930-940.
- Shakibaei, M.; Harikumar, K. B.; Aggarwal, B. B. Resveratrol addiction: To die or not to die. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53, 115-128.
- Shen, Chwan-Li; Smith, B. J.; Di-Fan; Lo; Chyu, Ming-Chien; Dunn, D. M.; Chen, Chung-Hwan; Kwun, In-Sook, Dietary polyphenols and mechanism of osteoarthritis. *J. of Nutr. Biochem.*, **2012**, 23, 1367-1377.

Bibliografia

- Shimura, M. Z. Y.; Asada, Y.; Yoshikawa, T.; Hatake, K.; Takaku, F.; Ishizaka, Y. Inhibition of Vpr-induced cell cycle abnormality by quercetina: A novel strategy for searching compounds targeting Vpr. *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**, 261, 308-316.
- Shin, J. S.; Kim, K. S.; Kim, M. B.; Jeong, J. H.; Kim, B. K. Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. *Bioor. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 869-874.
- Shulka, Y.; Singh, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2011**, 1215, 1-8.
- Spencer, J.P.E. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br. J. Nutr.* **2010**, 104, 40-47.
- Stamatis, H.; Sereti, V., Kolisis, FN. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, 11, 323–328.
- Sun, A. Y.; Wang, Q.; Simonyi, A.; Sun, G. Y. Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.*, **2010**, 41, 375-383.
- Szekeres, T.; Saiko, P.; Fritzer-Szekeres, M.; Djavan, B.; Jagger, W. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2011**, 89-95.
- Szkudelski, T. The insulin-suppressive effect of resveratrol: An in vitro and in vivo phenomenon. *Life Sciences*, **2008**, 82, 430–435.
- Theodosiou, E.; Loutrari, H.; Stamatis, H.; Roussos, C.; Kolisis, F. Biocatalytic synthesis and antitumor activities of novel sylibin acylated derivatives with dicarboxylic acids. *New Biotechnology*, **2011**, 28, 342-348.
- Torres, P.; Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J.; Ballenteros, A.; Plou, F. J. Regioselective Lipase-Catalyzed Synthesis of 3-O-Acyl Derivatives of Resveratrol and Study of Their Antioxidant Properties. *J. Agric. Food Chemistry*, **2010**, 58, 807-813.
- Torres, S.; Castro, G. R. Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42, 271-277.
- Turan, B.; Tuncay, E.; Vassort, G. Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vivo and in vitro studies. *J. Bioenerg. Biomenbr.*, **2012**, 44, 281-296.
- Turner, NA.; Vulfson, E. N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb. Technol.*, **2000**, 27, 108–113.
- Urpi-Sarda, M.,J' auregui, O., Lamuela-Raventos, R. M., Jaeger, W., Miksits, M., Covas, M. I., et al. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 3149–3155.

- van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 501-519.
- Vakhlou, J.; Kour, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *E.J. Biotechnol.*, **2006**, 9, 69-85.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology*, **2006**, 16 (3), 296–300.
- Vasquez-Martinez, Y.; Ohri, RV.; Kenyon, V.; Holman, T. R.; Sepúlveda-Boza, S. Structure-activity relationship studies of flavonoids as potent inhibitors of human platelet 12-hLO, reticulocyte 15-hLO-1, and prostate epithelial 15-hLO-2. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 7408-7425.
- Villeneuve, P.; Hills, G.; Bachain, P.; Pina, M.; Caro, Y.; Bareá, B. Lipase catalyzed synthesis of quinate and glucuronate fatty esters. *Eur. J. Lip. Sci. Technol.*, **2002**, 104, 394–401.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., and Bose, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agr. Food Chem.*, **2001**, 49, 5315–5321.
- Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., and Proch, J. Dried fruits: Excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2005**, 24, 44–50.
- Viskupicova, J.; Ondrejovic, M.; Sturdik, E. The potential applications of acylated flavonoids. *Pharmazie*, **2009**, 64, 355-360.
- Viskupicova, J.; Danihelova, M.; Ondrejovic, M.; Liptaj, T.; Sturdik, E. Lipophilic rutin derivatives for oxidation protection. *Food Chemistry*, **2010**, 123, 45-50.
- Wang, H. K.; Xia, Y.; Yang, Z. K.; Natschle, S. L.; Lee, K. H. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and ant-HIV agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, 439, 191-225.
- Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y., & Wu, J. M. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, **2002**, 9 (1), 77–79.
- Wang, Z., Zou, J., Cao, K., Hsieh, T., Huang, Y., & Wu, J. M. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *International Journal of Molecular Medicine*, **2005**, 16 (4), 533–540.
- Wang J, Gao JS, Chen JW, Li F, Tian J. Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. *Rheumatol. Int.*, **2011**, 32, 1541-1548.

Bibliografia

- Weinreb, O.; Mandel, S.; Amit, T.; Youdim, M.B. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Nutr. Biochem.*, **2004**, *15*, 506-516.
- Weng, Chia-Jui; Yeng, Gow-Chin Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, **2012**, *38*, 76-87.
- Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., & Somoza, V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2005**, *49*, 5, 482–494.
- Williams, R. J.; Spencer, J. P.E. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanism, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **2012**, *52*, 35-45.
- Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., & Hale, A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical Chemistry*, 1995, *41* (1), 32–35.
- Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M., et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, **2004**, *430* (7000), 686–689.
- Yamamura, S.; Ozawa, K.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, k. Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*, **1998**, *48*, 131-136.
- Young I. S, Woodside J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, **2001**, *54*, 176–86.
- Zenebe, W.; Pechanova, O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy*, **2002**, *103*, 159-165.
- Zern, T. L. and Fernandez, M. L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.*, **2005**, *135*, 2291–2294.