



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

FERNANDA PINHEIRO DE CARVALHO RIBEIRO

**OBTENÇÃO DE RUTINA RICINOLEATO ATRAVÉS DA
REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO COM ÓLEO DE
MAMONA**

Feira de Santana – Ba

2016

FERNANDA PINHEIRO DE CARVALHO RIBEIRO

**OBTENÇÃO DE RUTINA RICINOLEATO ATRAVÉS DA
REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO COM ÓLEO DE
MAMONA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Branco

Feira de Santana - Ba

2016

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Ribeiro, Fernanda Pinheiro de Carvalho

R369o Obtenção de rutina ricinoleato através da reação de esterificação com óleo de mamona / Fernanda Pinheiro de Carvalho Ribeiro. – Feira de Santana, 2016.

122 f. : il.

Orientador: Alexsandro Branco.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2016.

1. Rutina – Acilação. 2. Óleo de mamona – Agente acilante. I. Branco, Alexsandro, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 577.164.3

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a. Mariana Borges Botura

Universidade Estadual de Feira de Santana


Prof.^a Dr.^a. Ingrid Estefania Mancia de Gutiérrez

Universidade Estadual de Feira de Santana


Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida

Universidade Estadual de Feira de Santana


Prof. Dr. Jener David Gonçalves dos Santos

Universidade Federal Rural de Pernambuco


Prof. Dr. Alexsandro Branco

Universidade Estadual de Feira de Santana

Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2016

À Jamerson Ribeiro, meu esposo, amigo e grande incentivador, com todo o meu amor.

À minha Júlia, meu bem maior, meu coração fora do peito...Te amo muito.

À minha mãe, meu porto seguro, meu anjo na terra, meu amor.

À meus irmãos, Ninha e Neto. Amo muito vocês.

À Zezé, por torcer sempre por mim. Anjo no céu.

AGRADECIMENTOS

Ao senhor Deus do universo, pela infinita bondade, misericórdia e por me dar forças todos os dias, especialmente nesta difícil, porém gratificante jornada;

A meus pais, Maria do Carmo e Luiz Antônio por me oferecem a oportunidade de estudar, além de todo apoio, carinho e compreensão;

Ao meu pai, Luiz Alberto, pela presença constante em minha vida e da minha família, a que tenho muito apreço e consideração;

Ao meu amado esposo Jamerson, a quem agradeço de maneira especial por todo amor, por acreditar em mim e pela bela família que constituímos juntos. Obrigada meu amor!

A minha amada filha Júlia por suportar as minhas tantas ausências ao longo desses anos, te amo tanto...

Aos meus irmãos Camila e Neto pela amizade e carinho de sempre e a meu pequeno e já tão amado sobrinho Paulinho;

Meus sinceros agradecimentos a meu orientador, Prof. Dr. Alexsandro Branco a quem manifesto a minha gratidão pelos preciosos ensinamentos, pela disponibilidade e rigor imprescindíveis para a realização deste trabalho e pelo privilégio de compartilhar seus conhecimentos;

A Prof^a Dr^a Carla Branco que sempre com muita atenção e carinho me ajudou na condução deste trabalho;

A Prof^a Me. Hélimar Gonçalves de Lima pelos ensaios de Toxicidade;

Aos amigos do laboratório de Fitoquímica, Patrícia, Calila, Renata, Júlia, Verônica, Saraí, Mateus, Sônia, Kelly, Lissandra e especialmente Isabela que não mediu esforços para me ajudar tantas vezes, pela disponibilidade e paciência; agradeço todo o carinho e amizade de vocês;

Aos amigos Getúlio, Célia, Ilca, Juliana, Marcos e Tiago pelo apoio e palavras de incentivo;

A amiga Tarcisa pela amizade e pelas mensagens que sempre me deram ânimo;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) pelos ensinamentos e pela oportunidade e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado;

A coordenadora do programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV), Prof^a Dr^a Claudinéia Regina Pelacani Cruz pelas informações e inúmeros auxílios prestados;

A todos os amigos que fiz durante o doutorado.

“Quando abro a porta de uma nova descoberta já encontro Deus lá dentro”

Albert Einstein

RESUMO

O flavonoide rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) se destaca entre os produtos naturais como uma alternativa promissora no combate às doenças degenerativas e relacionadas ao envelhecimento. No entanto, a baixa solubilidade e estabilidade da mesma em diferentes meios, especialmente lipofílicos, limitam as aplicações em preparações farmacêuticas. A transformação biocatalítica, através da acilação enzimática, tem sido sugerida por diversos autores, com bons rendimentos reacionais. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi promover a acilação enzimática da rutina, utilizando óleo de mamona como agente acilante e lipase como catalizador, caracterizar o produto formado, estimar o rendimento da bioconversão, além de investigar *in vitro* a atividade antioxidante e o efeito citotóxico do produto reacional frente às células Vero. A transformação catalítica ocorreu em temperatura de 50°C, durante 120 horas. O produto foi submetido à cromatografia em coluna, seguida de filtração por Sephadex LH-20. A estrutura química da rutina-*O*-ricinoleato, foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ¹H e de ¹³C e por cromatografia líquida/espectroscopia de massas (CLAE/EM). Em outro experimento, foi verificado o teor de formação do éster por Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a um detector de arranjos Diodos (CLAE-DAD), em condições que permitiram avaliar o rendimento reacional ao longo de 120 horas. O método analítico proposto foi validado considerando os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão, Limites de quantificação e de detecção mostrando-se adequado para a quantificação da rutina ricinoleato. Verificou-se pelos métodos avaliados, que o produto reacional manteve a capacidade antioxidante da rutina e que não houve evidência de citotoxicidade.

Palavras-chave: rutina; biocatálise; lipase; óleo de mamona

ABSTRACT

The flavonoid rutin (3-O-rutinosídeo-quercetin) stands out among the natural products as a promising alternative in the fight against degenerative diseases and related to aging. However, the low solubility and stability thereof in different media, especially lipophilic limited applications in pharmaceutical preparations. The biocatalytic transformation by enzymatic acylation has been suggested by several authors, with good reaction yields. In this sense, the objective of this study was to promote the enzymatic acylation of rutin, using castor oil as acylating agent and lipase as a catalyst, to characterize the formed product, estimate the efficiency of bioconversion, and to investigate *in vitro* the antioxidant activity and cytotoxic effect opposite the reaction product Vero cells. The catalytic transformation occurred at 50°C for 120 hours. The product was subjected to column chromatography, followed by filtration by Sephadex LH-20. The chemical structure of rutin-O-ricinoleate was determined by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ¹H and ¹³C and by liquid chromatography / mass spectroscopy (HPLC/MS). In another experiment, it was observed the formation of the ester content by High Performance Liquid Chromatography coupled to a detector diode arrangements (HPLC-DAD) under conditions which allow assessing the reaction yield over 120 hours. The analytical method proposed has been validated considering the linearity parameters, accuracy, precision, limit of quantification and detection proved to be suitable for quantification of ricinoleato rutin. It was found by this method that the reaction product maintained the antioxidant capacity of rutin and there was no evidence of cytotoxicity.

Keywords: rutin; biocatalysis; lipase; castor oil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Núcleo fundamental dos flavonoides	21
Figura 2	<i>Dimorphandra mollis</i> Benth: árvore nativa do Brasil e fonte de rutina	23
Figura 3	Fórmula estrutural da rutina	24
Figura 4	A: Lipase B de <i>Candida antarctica</i> e B: Estrutura cristalizada da CAL B complexada à rutina	28
Figura 5	Frutos (A) e sementes (B) da mamona	32
Figura 6	Fluxograma para obtenção, purificação e determinação estrutural da rutina ricinoleato	45
Figura 7	Cromatograma e espectro de UV do padrão de rutina	48
Figura 8	Cromatograma obtido por CLAE-DAD da reação de acilação enzimática da rutina com óleo de mamona- Fração RU1 (1: rutina e 2: éster formado durante a reação)	49
Figura 9	Cromatograma da reação de acilação, análise por HPLC	51
Figura 10	Isolamento e caracterização da rutina- <i>O</i> -ricinoleato por cromatografia líquida/espectroscopia de massas (CLAE/EM)	53
Figura 11	Espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	54
Figura 12	Espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (125 MHz, MeOD)	55
Figura 13	Esterificação da rutina (1) com óleo de mamona (2) catalisada por lipase	59
Figura 14	Cromatograma da solução padrão de rutina	60
Figura 15	Cromatograma da solução padrão de rutina ricinoleato	61
Figura 16	Curva de calibração da rutina ricinoleato	62
Figura 17	Curva de calibração da rutina	63

Figura 18	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de síntese da rutina ricinoleato: A: tempo zero, B: 1h de reação, C: 2h, D:4h, E:8h, F:16h	67
Figura 19	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de síntese da rutina ricinoleato: A: padrão de rutina, B: 24h de reação, C: 48h, D:72h, E:96h, F:120h de reação	69
Figura 20	Concentração em mg/mL de éster formado na reação de acilação enzimática ao longo de 120 horas	70
Figura 21	Percentual de viabilidade de células Vero após tratamento com a rutina ricinoleato no teste de MTT	72
Figura 22	Cultivo de células Vero após 24h de exposição ao éster de rutina: A: controle negativo e B: rutina ricinoleato 1 mg/mL	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Área plantada, produtividade e produção de mamona	31
Tabela 2	Condições reacionais utilizadas na esterificação da rutina	42
Tabela 3	Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para a fração RU1 em MeOD (δ em ppm e J em Hz), com os dados da rutina da literatura*	57
Tabela 4	Resultados dos valores experimentais para a construção da curva de calibração	62
Tabela 5	Equação da reta e coeficiente de correlação linear	63
Tabela 6	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	64
Tabela 7	Estudos de precisão para a rutina ricinoleato e rutina	65
Tabela 8	Dados de exatidão	65
Tabela 9	Concentração em mg/mL de rutina e de éster formado na reação de acilação ao longo de 120 horas	69

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	Ampliação entre as regiões 6,0 e 7,0 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	84
ANEXO II	Ampliação entre as regiões 5,0 e 5,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	85
ANEXO III	Ampliação entre as regiões 3,8 e 4,2 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	86
ANEXO IV	Ampliação entre as regiões 3,2 e 3,8 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	87
ANEXO V	Ampliação entre as regiões 2,0 e 2,4 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	88
ANEXO VI	Ampliação entre as regiões 0,8 e 1,7 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)	89
ANEXO VII	Ampliação entre as regiões 90 a 180 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (125 MHz, MeOD)	90
ANEXO VIII	Ampliação entre as regiões 50 a 80 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (125 MHz, MeOD)	91
ANEXO IX	Ampliação entre as regiões 30 a 38 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (125 MHz, MeOD)	92
ANEXO X	Ampliação entre as regiões 23 a 29 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (125 MHz, MeOD)	93
ANEXO XI	Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)	94
ANEXO XII	Ampliação 49 a 135 dos Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)	95

ANEXO XIII	Ampliação 32 a 56 dos Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)	96
ANEXO XIV	Ampliação 14 a 31 dos Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)	97
ANEXO XV	Espectro de HMBC do éster rutina (5125MHz, MeOD)	98
ANEXO XVI	Ampliação ^1H : 0,8 a ^{13}C : 0 a 180 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	99
ANEXO XVII	Ampliação ^1H : 5,2 a 7,8 e ^{13}C : 90 a 170 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	100
ANEXO XVIII	Ampliação (2) ^1H : 5,2 a 7,8 e ^{13}C : 90 a 170 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	101
ANEXO XIX	Ampliação ^1H : 0,5 a 5,0 e ^{13}C : 110 a 180 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	102
ANEXO XX	Ampliação (2) ^1H : 0,5 a 5,0 e ^{13}C : 110 a 180 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	103
ANEXO XXI	Ampliação ^1H : 3,2 a 5,6 e ^{13}C : 55 a 105 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	104
ANEXO XXII	Ampliação ^1H : 3,4 a 5,4 e ^{13}C : 60 a 85 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	105
ANEXO XXIII	Ampliação (2) ^1H : 3,4 a 5,4 e ^{13}C : 60 a 85 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	106
ANEXO XXIV	Ampliação ^1H : 3,4 a 5,6 e ^{13}C : 10 a 40 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	107
ANEXO XXV	Ampliação (2) ^1H : 3,4 a 5,6 e ^{13}C : 10 a 40 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	108
ANEXO XXVI	Ampliação ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 55 a 80 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	109

ANEXO XXVII	Ampliação ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	110
ANEXO XXVIII	Ampliação (2) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	111
ANEXO XXIX	Ampliação (3) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	112
ANEXO XXX	Ampliação (4) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	113
ANEXO XXXI	Espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	114
ANEXO XXXII	Ampliação ^1H : 0 a 8,0 e ^{13}C : 0 a 180 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	115
ANEXO XXXIII	Ampliação ^1H : 4,5 a 7,0 e ^{13}C : 70 a 140 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	116
ANEXO XXXIV	Ampliação ^1H : 3,4 a 4,2 e ^{13}C : 55 a 80 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	117
ANEXO XXXV	Ampliação (2) ^1H : 3,4 a 4,2 e ^{13}C : 55 a 80 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	118
ANEXO XXXVI	Ampliação ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	119
ANEXO XXXVII	Ampliação (2) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	120
ANEXO XXXVIII	Ampliação (3) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	121
ANEXO XXXIX	Ampliação (4) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)	122

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Flavonoides glicosilados: rutina e suas aplicações	21
2.2	Estratégias para lipofilização de flavonoides glicosilados	25
2.2.1	Óleo de mamona como agente acilante	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Reagentes	33
3.2	Equipamentos	33
3.3	Acilação enzimática da rutina: estudo preliminar	34
3.3.1	Secagem dos constituintes	34
3.3.2	Reação enzimática utilizando rutina e óleo de mamona	34
3.3.3	Análise cromatográfica	35
3.3.4	Purificação e caracterização do produto de reação	35
3.4	Reação para verificação do rendimento reacional	36
3.4.1	Preparo da solução padrão de rutina	37
3.4.2	Preparo da solução padrão do éster	37
3.4.3	Validação do método analítico	37
3.5	Avaliação de citotoxicidade em células vero	38
3.5.1	Cultivo de células	38
3.5.2	Tratamento dos cultivos de células	38
3.5.3	Avaliação da viabilidade celular	38
3.5.4	Análise estatística	39
3.6	Atividade antioxidante	39
3.6.1	Determinação de atividade antioxidante por DPPH•	39
3.6.2	Teste de Inibição da Auto-oxidação do beta-caroteno	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Obtenção de rutina ricinoleato	46
4.2	Determinação estrutural da rutina ricinoleato	51
4.3	Quantificação da rutina ricinoleato por CLAE-DAD	60
4.3.1	Otimização do método analítico	60

4.3.2	Validação do método de CLAE-DAD	61
4.3.2.1	Linearidade	61
4.3.2.2	Limite de detecção e quantificação	63
4.3.2.3	Precisão do método	64
4.3.2.4	Exatidão do método	65
4.3.3	Análise quantitativa da rutina ricinoleato	66
4.4	Análise de toxicidade da rutina ricinoleato	71
4.5	Análise da atividade antioxidante	73
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

Flavonoides glicosilados são compostos polifenólicos amplamente distribuídos na natureza. Podem ser encontrados em altas concentrações em frutas, vegetais e bebidas como vinhos e chás e também em suplementos dietéticos. São de considerável interesse especialmente pelas suas propriedades antioxidantes. Além disso, evidências científicas indicam que o uso destes compostos está associado à prevenção de doenças cardiovasculares, de processos neurodegenerativos e de diversos outros distúrbios associados ao stress oxidativo. Como resultado destas propriedades, estes compostos podem ser aplicados em diversas preparações industriais, especialmente como aditivos alimentares e na produção de medicamentos e cosméticos. Apesar das diversas atividades associadas a estes flavonoides, o uso dos mesmos é ainda limitado pela baixa solubilidade e estabilidade destas moléculas em sistemas lipofílicos (MANACH *et al.*, 2005; BISCOFF 2008; PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2014).

Modificações estruturais através de métodos de biocatálise têm sido investigadas de modo a melhorar a estabilidade e a lipossolubilidade destes compostos, além de explorar novas relações estrutura-atividade. Pesquisas indicam que o uso de enzimas em meios reacionais pode ser vantajoso no sentido de desenvolver metodologias alternativas com altas taxas de conversão em condições ambientais favoráveis (DHAKE *et al.*, 2013). Além disso, enzimas atuam como catalisadores altamente seletivos e exibem elevada quimio, régio e estereosseletividade, reduzindo a formação de produtos secundários, comuns em reações de síntese convencional (DUNN, 2012).

Muitas enzimas têm sido utilizadas como biocatalizadores em reações envolvendo modificações estruturais de flavonoides. A classe das lipases se destaca entre as hidrolases com maior aplicabilidade industrial (CARREA E RIVA, 2000).

A lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) tem sido utilizada em uma série de reações de acilação de flavonoides glicosilados como a rutina. Essa classe de enzimas é capaz de catalisar a formação de várias ligações éster, estando envolvidas na síntese de derivados fenólicos seletivamente modificados. A CAL B é capaz de promover a acilação regioseletiva das hidroxilas funcionais apenas na porção glicosídica da molécula sem afetar o núcleo flavonoídico, modificando suas propriedades físico-químicas, solubilidade e efetividade em formulações lipofílicas (MELLOU *et al.*, 2005).

Assim, a acilação enzimática tem sido utilizada com sucesso como uma estratégia para modificar a solubilidade de flavonoides glicosilados sem comprometer o núcleo básico responsável pela atividade antioxidante (HADDAD *et al.*, 2006). A lipofilização destes compostos, através de modificações estruturais tem sido sugerida por diversos autores, permitindo a descoberta de novos compostos bioativos (SHAHIDI & ZHONG, 2010; PATTI *et al.*, 2000).

A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um importante flavonoide glicosilado encontrado em numerosas formulações terapêuticas. Estruturalmente, apresenta um dissacarídeo (glicose + ramnose) ligados a posição 3 do anel pirano. A maior parte dos efeitos farmacológicos da rutina está associada à sua notória atividade antioxidante, pela sua elevada capacidade de sequestro de radicais livres. Esta atividade se dá pela rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais. Além disso, estão associados também à molécula, atividade hipolipidêmica, efeitos anti-inflamatórios, hepatoprotetores, antimicrobianos, anticarcinogênicos e antimutagênicos (CHUA, 2013; HOU *et al.*, 2004). Estes efeitos fazem deste composto um componente importante na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos como preservativo, estabilizante e corante natural (KASLOWKA *et al.*, 2010).

A síntese de derivados lipofílicos da rutina via esterificação enzimática das hidroxilas funcionais tem contribuído para o aumento da solubilidade da molécula em sistemas lipofílicos e emulsões. A esterificação de flavonoides glicosilados catalisada por lipases já está bem estabelecida na literatura. As pesquisas sugerem que um elevado grau de conversão é alcançado quando são empregadas condições ótimas de reação. A concentração e a natureza dos substratos, enzimas e solventes, bem como a quantidade de água e a temperatura são fatores que influenciam de maneira significativa o rendimento da acilação (CHEBIL *et al.*, 2006).

A atividade da CAL B é altamente influenciada pela natureza do solvente (NAKAJIMA *et al.*, 1999). A enzima mostra boa efetividade como biocatalista em reações que utilizam solventes orgânicos moderadamente polares como a acetona (LI *et al.*, 2008). O conteúdo de água no meio reacional é outra variável importante que afeta a atividade da CAL B. Enzimas hidrolíticas necessitam de uma pequena quantidade de água para que permaneçam ativas. A quantidade de água no meio reacional contribui para a estabilidade térmica e estrutural e funcional da enzima. O uso de peneiras moleculares tem sido uma estratégia efetiva para controlar o conteúdo de água, além de

manter o equilíbrio de reações envolvendo lipases (GAYOT *et al.*, 2003; KANTOGIANNI *et al.*, 2003).

Além da seleção da enzima, a natureza do agente acilante também é um parâmetro importante, pois afeta não somente as propriedades físico-químicas, mas também as propriedades biológicas dos ésteres gerados. Diversos estudos descrevem o uso de óleos vegetais como substratos para acilação enzimática de flavonoides envolvendo CAL B (ALMEIDA, 2011). O óleo de mamona extraído das sementes de *Ricinus communis L.*, apresenta ampla aplicação industrial, especialmente na indústria de cosméticos (CHIERIC; CLARO NETO, 2001). O óleo consiste em uma mistura de triglicerídeos, uma combinação de ácidos graxos saturados e insaturados associados ao glicerol. Cerca de 84-91% do óleo é composto por ácido ricinoléico (ácido 12-hydroxyl-9-octadecenoico), um ácido graxo monoinsaturado (FREIRE, 2006). A alta viscosidade e a solubilidade exclusiva do óleo em álcool deve-se a presença do grupamento hidroxila (C18:1-OH). O óleo e seus isolados são de baixo custo e biodegradáveis (KYOBE *et al.*, 2016).

Além da enzima, do solvente e do controle de água reacional, a esterificação enzimática em solventes orgânicos é favorecida pelo excesso de agente acilante e pela temperatura da reação (PATTI *et al.*, 2000).

Doadores acila de cadeia longa são usualmente utilizados na esterificação da rutina (KANTOGIANNI *et al.*, 2003). O ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico), um ácido graxo de cadeia longa, monoinsaturado, é o componente majoritário do óleo extraído da semente de mamona (*Ricinus communis*), correspondendo a cerca de 90% da composição do mesmo. A presença de uma única hidroxila, de instauração e de um grupo carboxila terminal confere ao óleo características únicas que permite uma ampla gama de utilização na indústria farmacêutica, de cosméticos, polímeros, biodiesel, etc. A hidroxila funcional está sujeita a uma variedade de reações, destacando-se entre elas, a esterificação (ANDO *et al.*, 2004).

Apesar dos diversos estudos que comprovam a ausência de toxicidade da rutina, não se sabe ao certo se tais efeitos se estendem aos compostos derivados deste flavonoide, como o éster isolado e identificado neste estudo. Em determinadas situações, alguns flavonoides e seus derivados podem atuar como pró-oxidantes, induzindo a apoptose celular (KIM e JANG, 2009).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi promover a síntese da rutina-O-ricinoleato, um antioxidante lipofílico usando lipase imobilizada de *Candida antarctica* e óleo de mamona como agente acilante. Além disso, durante o experimento, também foi investigado o efeito citotóxico do éster em cultivo celular com células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano) pelos testes de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e azul de tripan e a atividade antioxidante através do método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) e beta-caroteno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Flavonoides glicosilados: rutina e suas aplicações

Os flavonoides compõem uma extensa classe de compostos naturais polifenólicos sintetizados por plantas. Eles podem ser encontrados em diversas formas estruturais, no entanto, a maioria é constituída por 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, com estrutura fenólica variável. A estrutura dos flavonoides está baseada no núcleo difenil propano ($C_6-C_3-C_6$), composto por dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 1) (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os flavonoides apresentam-se frequentemente oxigenados e podem ocorrer como agliconas (isentos de glicídeos), conjugados a açúcares (flavonoides glicosilados) ou outras substituições em uma ou mais hidroxilas incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações e sulfatações (MACHADO, 2005).

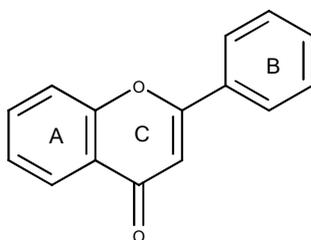


Figura 1. Núcleo fundamental dos flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2007)

Flavonoides estão presentes nas angiospermas e muitas gimnospermas em diferentes partes das plantas. São importantes componentes da dieta humana, apesar de não ser considerados nutrientes. Podem ser encontrados em alimentos como frutas (maçã, uva, morango), verduras (couve, brócolis), grãos, nozes, vinhos tintos e sementes (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos apontam que dietas ricas em flavonoides estão relacionadas ao aumento da longevidade e a baixa incidência de doenças cardiovasculares (LOPEZ-REVUELTA *et al.*;2006).

Os flavonoides estão associados a uma série de ações bioquímicas e farmacológicas, destacando-se a capacidade antioxidativa *in vitro*, atividade anti-inflamatória, hepatoprotetora, antitrombótica e vasodilatadora, ação antialérgica, anticancerígena, antimicrobiana, antivirais, entre outras (HARBONE, 1988).

A descoberta de que os compostos flavonoídicos apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas e capacidade de interação com outras substâncias motivaram as pesquisas acerca da química destes metabólitos, estimulando uma série de estudos para explorar o potencial farmacológico dos mesmos.

A maior parte das atividades biológicas dos flavonoides está associada ao potencial antioxidante destes, pela habilidade de reduzir a formação de radicais livres e de remover espécies reativas de oxigênio, além da capacidade de complexar metais, particularmente metais bivalentes. A habilidade em quelar metais é um importante fator que influencia não somente na proteção contra os sinais do envelhecimento cutâneo, como também na redução da inflamação e na proteção vascular. Por isso, o potencial antioxidante dos flavonoides é explorado principalmente na prevenção de patologias associadas ao estresse oxidativo, como nos distúrbios cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e nos danos provocados pelo excesso de fragilidade vascular (MOHD ZAINOL *et al.*, 2009; BIESAGA, 2011).

O comportamento antioxidante dos flavonoides depende de características como o grau e a posição da hidroxilação, o tipo e a posição dos substituintes adicionais, a presença de duplas ligações ou conjugação e a glicosilação (LE, CHIU & NG, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A glicosilação dos flavonoides nos vegetais aumenta a solubilidade dos mesmos em água. Dentre as diversas substituições glicídicas podemos citar a galactose, xilose, glicose, ramnose, e arabinose, sendo a glicose o açúcar mais comumente ligado. Flavonoides O-glicosilados de flavonas e flavonóis e C-glicosilados de flavonas estão entre os mais numerosos grupos de flavonoides glicosilados. A atividade biológica do glicoflavonoide está associada ao tipo e a posição da ligação glicídica. Flavonoides glicosilados têm sido isolados de diversas plantas e a investigação destes compostos permanece uma das áreas mais ativas na pesquisa de flavonoides (VEITCH e GRAYER, 2011).

A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) é um composto fenólico de baixo peso molecular pertencente à subclasse dos flavonóis, encontrada extensivamente na natureza, em frutas, legumes e verduras. A quantidade de rutina em cada tipo de

alimento pode variar e depende de características associadas, por exemplo, ao tipo de solo e à estrutura genética da planta.

A rutina pode ser encontrada em alguns tipos de frutas cítricas como limão, lima e laranja. Outras frutas como amoras, mirtilos, cerejas e damascos são também considerados fontes naturais do flavonoide. No Brasil, a rutina é extraída principalmente do fruto do faveiro (*Dimorphandra mollis*), uma planta nativa de regiões do cerrado (Figura 2). Outras importantes fontes vegetais de rutina são: *Sophora japonica* L., uma árvore japonesa, conhecida como pagoda, e *Faopyrum esculentum* Moech, o trigo sarraceno (PEDRIALLI, 2005).



Figura 2. *Dimorphandra mollis* Benth: árvore nativa do Brasil e fonte de rutina

Fonte: <http://www.flickrriver.com/photos/tags/dimorphandramollis/interesting/>

A rutina é um flavonoide glicosilado também conhecido como vitamina P. É denominada quimicamente de 3,3',4',5,7-pentahydroxiflavona-3-rutinosídeo. Apresentam uma carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 do anel (C) (Figura 3). Sua biossíntese se dá a partir da combinação das vias do chiquimato e acetato. Tem a aparência de um pó fino amarelo, esverdeado, identificada na forma de cristais em agulha (PEDRIALI, 2005).

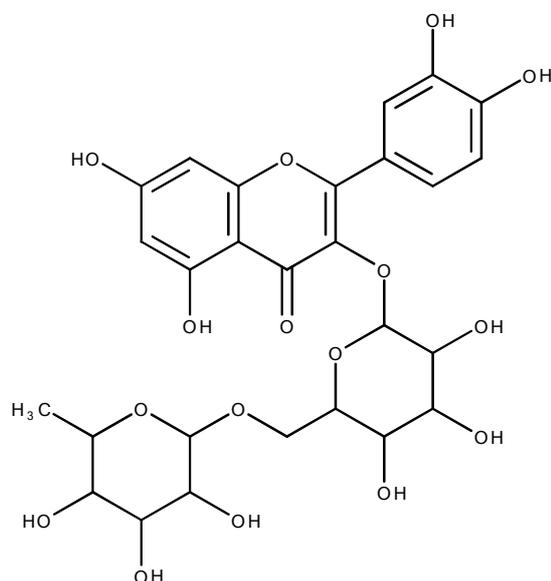


Figura 3: Fórmula estrutural da rutina

A rutina apresenta múltiplas atividades farmacológicas, incluindo ação antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, antiedematosa, antivaricosa e anticelulítica, além de vasodilatador e imunomodulador (JANBAZ *et al.*, 2002). É empregada como potente antioxidante e vasoprotetora, destacando-se no tratamento de distúrbios associadas à fragilidade capilar excessiva. Vários mecanismos estão associados à redução da permeabilidade vascular, como a inibição da hialuronidase, a inibição da liberação de mediadores inflamatórios e da histamina e inibição da oxidação da adrenalina (J. ACRT, K. PYTKOWSKA, 2008).

O ácido hialurônico é um dos mais importantes componentes do tecido conjuntivo. Sua decomposição pela enzima hialuronidase está associada ao aumento da permeabilidade capilar. Os flavonoides reduzem a atividade da hialuronidase, prevenindo a decomposição do ácido hialurônico e reduzindo desta forma, a fragilidade dos vasos capilares.

Os mediadores inflamatórios também são responsáveis pelo aumento da permeabilidade capilar. A maior parte deles é produzida a partir de ácido araquidônico da membrana plasmática, como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. A

inibição da liberação destes mediadores contribui para a redução da resposta inflamatória (GUARDIA *et al.*, 2001).

Estas propriedades da rutina são potencialmente benéficas na prevenção de doenças geradas pelo dano oxidativo da pele, o que justifica as constantes pesquisas relacionadas à incorporação da rutina como componente ativo de produtos cosmeceuticos.

Outras importantes atividades associadas à Rutina devem-se à capacidade do flavonoide em inibir a peroxidação lipídica induzida por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (MILDE *et al.*, 2004).

Flavonoides glicosilados como a Rutina estão associados a diversas atividades biológicas e por isso têm sido alvo de grande interesse da indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. No entanto, a baixa solubilidade e estabilidade destes compostos, principalmente em matrizes lipídicas e meios lipofílicos limitam o uso dos mesmos (KATSOURA, 2007). Sabe-se que parte da atividade dos flavonoides está atrelada à estrutura química, porém o grau de lipossolubilidade interfere de maneira significativa no potencial biológico dos mesmos. Em muitos casos, a lipofilização pode resultar no aumento da atividade antioxidante em comparação com o composto fenólico original (JOSE *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2010).

A modificação estrutural destes compostos via acilação enzimática das hidroxilas funcionais muda as propriedades físico-químicas e aumenta a solubilidade destes compostos em meios lipofílicos.

2.2 Estratégias para lipofilização de flavonoides glicosilados

Na natureza encontramos uma rica variedade de estruturas moleculares com propriedades biológicas únicas, que as tornam pontos de partida ideais para a descoberta de novas drogas. Apesar das constantes pesquisas na área de produtos naturais, estudos revelam que somente 6% das novas moléculas são isoladas diretamente de fontes naturais. Em contraste, mais de metade destas moléculas são derivadas de reações de síntese ou semi-síntese. Tal fato explica o grande interesse no desenvolvimento de métodos eficientes que possibilitem a modificação de compostos naturais e a obtenção de novas substâncias de interesse farmacêutico. Entretanto, a fragilidade química, a complexidade estrutural e a diversidade funcional dos produtos naturais tornam

desafiadoras estas transformações (GONZÁLEZ-SABIN, MORÁN-RAMALLAL, REBOLLEDO, 2011).

Neste sentido, o uso de enzimas em reações de síntese tem se tornado uma alternativa valiosa nos últimos anos. Com os recentes avanços na área de biocatálise, muitas enzimas vêm sendo utilizadas em processos catalíticos capazes de promover transformações de numerosos substratos que dificilmente seriam obtidos por vias químicas convencionais. Portanto, metodologias envolvendo catálise enzimática constituem uma importante alternativa à síntese química. Além disso, as enzimas atuam como catalisadores altamente seletivos, capazes de gerar produtos específicos (KAUL *et al.*, 2004).

O uso de enzimas em reações biocatalíticas criou diversas oportunidades para modificações regioseletivas de compostos poliidroxilados, como os flavonoides (LI *et al.*, 2008). Estas reações podem melhorar não apenas as propriedades físico-químicas destes compostos, mas também suas propriedades biológicas aumentando, por exemplo, a permeabilidade dos mesmos através das membranas celulares (SUDA *et al.*, 2002).

Uma das primeiras transformações biocatalíticas foi a acilação enzimática regioseletiva (CESTI, ZAKS and KLIBANOVI, 1985). Diversos derivados acilados tiveram suas estabilidades e atividades biológicas melhoradas quando comparadas aos respectivos compostos originais.

Hidrolases e aciltransferases, duas diferentes classes de enzimas são geralmente empregadas em reações de acilação. Além de catalisar a hidrólise de uma variedade de substratos, a maioria delas, especialmente as lipases (triacilglicerolhidrolases) pode atuar também em solventes orgânicos catalisando reações de esterificação e transesterificação. Lipases também catalisam a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA *et al.*, 2001). Em condições adequadas, as reações de síntese são favorecidas em detrimento à hidrólise (VAKHLU and KOUR, 2006). O conteúdo de água da reação é um parâmetro muito importante já que a presença de água modifica o equilíbrio termodinâmico da reação direcionando-a no sentido de hidrólise, além de influenciar a atividade, a termoestabilidade e a estereoseletividade da enzima (KOELLER, 2001; KLIBANOVE, 2001).

As lipases são reconhecidas como uma classe com elevada atividade catalítica, boa estabilidade e ampla tolerância ao substrato (GAO *et al.*, 2012). Estas enzimas desempenham um importante papel em processos biotecnológicos, não apenas no processamento de alimentos, mas também na síntese de intermediários quirais

especialmente relacionados à indústria química e farmacêutica. São empregadas na síntese de compostos quirais através de processos de hidrólise enantioselectiva ou reações de esterificação/transesterificação em solventes orgânicos. Além da natureza estereosseletiva das lipases, suas propriedades regioselectivas têm sido também exploradas para a síntese de compostos de difícil obtenção por métodos químicos puros (MIYAZAWA *et al.*, 2015).

Os crescentes estudos envolvendo biocatalisadores tem resultado no aumento da produção de ésteres pelo uso de enzimas como lipases. Diversos trabalhos têm sido realizados neste sentido e muitos compostos biologicamente ativos já foram identificados e quimicamente caracterizados.

Reações de esterificação envolvendo lipases podem melhorar as propriedades lipofílicas dos flavonoides glicosilados. Na maioria das esterificações, mais de um grupo hidroxil pode ser acilado, o que leva a uma mistura de produtos com vários graus de esterificação, provocando a redução ou perda da atividade biológica do flavonoide. A catálise enzimática é uma alternativa a este processo já que enzimas normalmente apresentam um alto grau de regioselectividade (WANG *et al.*, 2013). A biocatálise apresenta uma série de vantagens quando comparada aos métodos químicos convencionais e a imobilização destas enzimas, possibilita a reutilização das mesmas em várias reações, melhora a estabilidade, além de facilitar a recuperação do produto final e o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima (ADAMCZAK and KRISHNA, 2004). As enzimas usadas na acilação enzimática de flavonoides estão normalmente na forma imobilizada.

Lipases podem ser extraídas de uma variedade de fontes, especialmente bactérias e fungos. A transformação enzimática utilizando a lipase B de *Candida antarctica* tem sido utilizada como alternativa para melhorar a efetividade de flavonoides glicosilados em formulações lipofílicas (Figura 4).

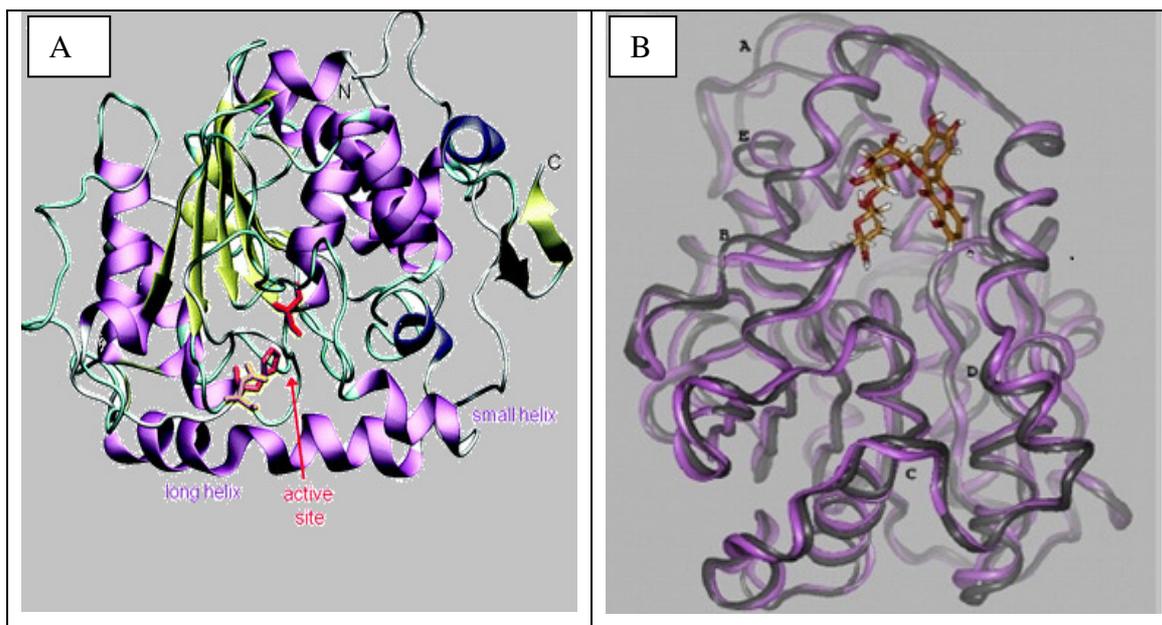


Figura 4. A: Lipase B de *Candida antarctica* ; B: Estrutura cristalizada da CAL B complexada à rutina, onde são encontradas as seguintes diferenças na cadeia principal: (A): Cys311-Gly313 correspondendo aos laços entre as hélices $\beta 8$ e $\beta 9$; (B): Val190-Pro-192 contendo laços que conectam as hélices nas posições $\beta 6$ e $\beta 7$; (C) Asn259-pro262 contendo laços que conectam as hélices $\alpha 9$ e $\alpha 10$; (D): Asn85-Ile87 contendo na hélice hélices $\alpha 3$; (E): Thr158-Ala162, contendo um laço entre as hélices $\alpha 9$ e $\alpha 10$.

Fonte: De oliveira *et al.*, 2009.

A lipase B de *Candida antarctica* é uma das enzimas mais amplamente utilizadas em processos de biocatálise em síntese orgânica, especialmente na esterificação de flavonoides glicosilados.

A acilação consiste em uma importante estratégia para aumentar a lipossolubilidade de vários metabólitos, além de estabilizar a estrutura e impedir a degradação dos compostos gerados (PATTI *et al.*, 2000).

A acilação enzimática da naringina utilizando a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada resultou na síntese do ricinoleato de naringina (ALMEIDA *et al.*, 2011). No trabalho, a acetona foi escolhida como solvente para a reação, pois segundo os autores forneceu melhor rendimento e solubilização dos compostos utilizados. O óleo de mamona foi utilizado como agente acilante por apresentar em sua composição, aproximadamente 95% do ácido ricinoléico, o que tornou o óleo vegetal apropriado a modificações químicas.

A CALB imobilizada em resina acrílica foi utilizada na biocatálise de um derivado acilado do phloridzin, um flavonoide da família da diidrochalcona. A acilação

regiosseletiva resultou na formação do phloridzin-6'-O-cinnamato (ENAUD *et al.*, 2004).

Muitos estudos envolvendo o uso de lipases em trabalhos de esterificação de flavonoides têm sido reportados na literatura. Os estudos não se limitam apenas as áreas químicas ou farmacêuticas, as áreas de alimentos e cosméticos também têm investido neste grupo de enzimas.

Viskupicova *et al.* (2010) em um estudo realizado na Eslováquia, avaliaram a influência da esterificação da rutina como produto antioxidante em alimentos. Segundo o estudo, quando adicionado a alimentos estes compostos retardam a oxidação tóxica além de manter a qualidade nutricional e aumentar vida útil destes compostos. Os autores utilizaram a Lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) imobilizada como catalizador da reação com diferentes ácidos graxos saturados e insaturados. Com os resultados obtidos, os autores sugeriram que a modificação seletiva da molécula de rutina mantém a capacidade antioxidante da molécula original além de aumentar a solubilidade em lipídeos, melhorando assim a eficiência destes ésteres em meios lipofílicos.

Duan *et al* (2006) avaliaram a reação de esterificação da rutina utilizando ácido esteárico como agente acilante. A reação foi catalisada pela CAL B (Novozym 435), gerando como produto, o estereato de rutina.

A CAL B tem se mostrado efetiva como biocatalizador em reações que utilizam acetona como solvente orgânico (ALMEIDA *et al.*, 2011). Solventes orgânicos de moderada polaridade como a acetona (LI *et al.*, 2008) são considerados bons meios para a acilação enzimática regiosseletiva. Sabe-se que o meio reacional desempenha um importante papel na conversão biocatalítica para que a enzima permaneça ativa e não seja desnaturada. A atividade da CAL B é altamente influenciada pela natureza do solvente (NAKAJIMA *et al.*, 1999). Estes autores sugerem que a acetona e acetonitrila são os solventes mais apropriados para estas reações. Os solventes precisam ser compatíveis também com os substratos utilizados na reação.

O conteúdo de água no meio reacional é outra importante variável que afeta a reatividade da CAL B. Na síntese de palmitato de naringina catalisada pela enzima verificou-se que quanto menor o conteúdo de água na reação, maior era a atividade da enzima (GAYOT *et al.*, 2003). As enzimas hidrolíticas precisam de uma pequena quantidade de água para que possam se manter ativas, a quantidade de água no meio reacional contribui para a estabilidade térmica, estrutural e para garantir a

funcionalidade da enzima. O uso de peneiras moleculares tem sido uma eficiente estratégia para controlar a quantidade de água e conseqüentemente manter o equilíbrio das reações envolvendo lipases.

Estas reações de síntese são frequentemente influenciadas por fatores como as propriedades físico-químicas do meio e o comprimento das cadeias de carbono dos grupos doadores e os compostos aceptores. Portanto, a escolha dos solventes e dos substratos são variáveis importantes no rendimento da reação.

2.2.1 Óleo de mamona como agente acilante

Diversos substratos têm sido utilizados na acilação enzimática de flavonoides. Nas transformações catalisadas pela CAL B ácidos graxos com diferentes cadeias de carbono têm sido investigados. Neste sentido, a acilação enzimática com óleo de mamona tem mostrado bons resultados.

O óleo de mamona é extraído das sementes da mamoneira (*Ricinus communis*), uma planta de origem afro-asiática pertencente à família Euphorbiaceae (Figura 5). O uso do óleo é conhecido desde a antiguidade, principalmente pelas suas propriedades medicinais, porém, ao longo dos anos, através de pesquisas na área de química, o óleo e seus derivados ganharam múltiplas utilizações em diversos setores, com destaque à indústria têxtil, de tintas, selantes, lubrificantes, emulsionantes, além da área de cosméticos e produtos farmacêuticos (CHIERICE; CLARO NETO, 2001).

A Índia é o maior produtor mundial do óleo de mamona, ultrapassando 1.600.00 toneladas em 2013, estando à frente de países como China e Moçambique, que produzem cerca de 60 mil toneladas cada um. No Brasil, o óleo apresenta elevada importância econômica, com inúmeras aplicações na indústria nacional, a mamona é base de produtos tão diversos como cosméticos e óleo de rícino. O país está entre os principais produtores mundiais, sendo que no mercado interno, a Bahia é considerada o maior produtor nacional da cultura, produzindo aproximadamente 98 mil toneladas entre 2014 e 2015 (CONAB, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1 . Área plantada, produtividade e produção de mamona no Brasil

Mamona - BRASIL									
REGIAO/UF	Série Histórica de Área Plantada (em mil hectares)			Série Histórica de Produtividade (em kg/ha)			Série Histórica de Produção (em mil toneladas)		
	2012/13	2013/14	2014/15	2012/13	2013/14	2014/15	2012/13	2013/14	2014/15
NORDESTE	84,4	98,6	136,4	163	439	318	13,8	43,3	105,6
PI	1	0,7	0,6	75	300	805	0,1	0,2	0,5
CE	12,8	11,2	11,2	140	284	468	1,8	3,2	5,2
PE	1,4	4,9	4,9	267	334	452	0,4	1,6	2,2
BA	69,2	81,8	119,7	166	468	816	11,5	38,3	97,7
SUDESTE	2,1	2,5	0,9	694	432	1.405	1,5	1,1	1,0
MG	2	2,4	0,8	630	450	1.038	1,3	1,1	0,8
SP	0,1	0,1	0,1	1.980	1	1.856	0,2	-	0,2
SUL	0,9	0,2	0,2	600	622	622	0,5	0,1	0,1
PR	0,9	0,2	0,2	600	622	622	0,5	0,1	0,1
NORTE/NOR-DESTE	84,4	98,6	136,4	163	439	318	13,8	43,3	105,6
CENTRO-SUL	3	2,7	1,1	666	446	1.263	2	1,2	1,1
BRASIL	87,4	101,3	137,5	180	439	325	15,8	44,5	106,7

Fonte: 5º levantamento da safra 2014/2015/Conab

O óleo pode ser obtido por meio de diferentes técnicas como extração por solvente ou através de prensagem fria ou quente das sementes. Apresenta a seguinte composição aproximada: 2,5% de ácidos graxos saturados, 4% de ácido oléico, 5% de ácido linoleico, 0,5 % de ácido linolênico e cerca de 84% a 91% do óleo é composto pelo ácido ricinoléico. O teor de óleo nas sementes pode variar de 45% a 50% (FREIRE *et al.*, 2006).

O ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-*cis*-octadecenóico), componente majoritário do óleo, contém três grupos altamente reativos: o grupo carboxila no carbono 1, a presença de dupla ligação no carbono 9 e a hidroxila no carbono 12. O grupo hidroxila presente está sujeitos a uma variedade de reações, como por exemplo, a esterificação. Além disso, esta hidroxila confere a exclusiva propriedade de solubilidade do óleo em álcool (OGUNNIYI, 2006). A presença destes grupamentos permite qualidades específicas à produção de diversos produtos industriais, além de conferir ao óleo estabilidade e alta viscosidade (BELTRÃO, 2004).



Figura 5. Frutos (A) e sementes (B) da mamona
Fonte:<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016>

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A enzima lipase B de *C. antarctica* (recombinante em *Aspergillus oryzae*) imobilizada em pérolas, utilizada como catalizador e a peneira molecular (3Å) para a secagem dos constituintes foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich®, bem como o flavonoide rutina (96%). O óleo de mamona comercial adquirido da empresa Natural Rural e a acetona (Quimis) foram utilizados como substrato e solvente, respectivamente. Todos os solventes e reagentes foram utilizados em grau analítico para as análises da reação de acilação por CLAE-DAD. A água (grau HPLC) foi obtida do sistema Milli Q.

O teste antioxidante foi realizado com DPPH•, padrão de rutina (Sigma Aldrich®) e etanol P.A (Cromoline®).

3.2 Equipamentos

As reações foram desenvolvidas em incubadora refrigerada com agitação (tipo shaker), de bancada modelo TE 424, TECNAL® com plataforma de movimento orbital e temperatura controlada.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Líquidos Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000 com Detector de Arranjo Diodos (DAD), coluna Acclaim RP 18 (250 x 4,6 nm, 5µm). Os dados foram adquiridos e processados usando o Chromeleon software.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (1D e 2D) foram registrados em espectrômetros JEOEL®Eclipse-400 (¹H:400; ¹³C:100MHz) e Bruker®DRX-500 (¹H:500MHz; ¹³C:400MHz), em tubos de 5 mm, sendo as amostras solubilizadas em MeoD (metanol deuterado) como solvente e TMS (Tetrametilsilano) como referência interna.

As análises por CLAE-EM foram realizadas em espectrofotômetro de massas Bruker Daltonics® (modelo Equire Plus 3000), com fonte de íons eletrospray (ESI) e analisador *ion trap* e cromatógrafo Shimadzu® com coluna Phenomenex Luna C18

(250 x 4,6 nm, 5µm), Bombas LC-20 AD, Controladora CBM-20A, Detector SPD-20A e injetor automático SIL-20AC.

O teste antioxidante com DPPH• foi realizado em leitora de microplacas Multiskan FC leitor (Fisher Scientific) a 492 nm. E o teste de auto-oxidação do beta-caroteno foi realizado em aparelho Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer a 470 nm.

3.3 Acilação enzimática da rutina: estudo preliminar

3.3.1 Secagem dos constituintes

Para assegurar a integridade e preservar as características dos constituintes da reação, a sílica gel foi utilizada como agente dessecante e desumidificante. Para o experimento, foi selecionada a sílica azul pigmentada com cobalto, que atua como indicador de saturação. A secagem dos componentes foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Gayot *et al* (2003). A rutina e o óleo de mamona foram secos em dessecador com sílica gel sob vácuo por 7 dias. A sílica foi ativada previamente por secagem em estufa durante 4 h à temperatura de 110 °C. A acetona também passou por processo de secagem com a adição de 100 g.L⁻¹ (10% p/v) de peneira molecular, sendo acondicionada em frasco para reagente em vidro borossilicato com anel de vedação (frasco Shot), mantida sob estas condições durante 7 dias. Antes de ser adicionada à acetona, a peneira foi previamente seca em estufa a 150°C durante 24 horas. Toda a vidraria utilizada também estava totalmente seca, evitando que os substratos ficassem aderidos nas paredes e no fundo dos frascos.

3.3.2 Reação enzimática utilizando rutina e óleo de mamona

Foram pesados 0,7 g de rutina e 2,1 g de óleo de mamona (agente acilante). Estes substratos foram solubilizados em 25 mL de acetona previamente seca. Para garantir a solubilização completa dos componentes da reação, o óleo e a acetona foram aquecidos a 40 °C por 5 minutos. Em seguida, a rutina foi adicionada e todo o material foi novamente aquecidos a 40 °C por mais 5 minutos. Posteriormente, 500 mg de lipase imobilizada foi adicionada ao meio, iniciando a reação. Para manter a quantidade ótima

de água no meio reacional, foram adicionadas 100 g.L⁻¹ (aproximadamente 5g) de peneira molecular (3Å). Após cuidadosa checagem de todos os parâmetros, a reação foi desenvolvida em estufa incubadora “shaker” de bancada, com agitação orbital de 80 rpm, à temperatura de 50 °C, durante 120 horas.

A bioconversão foi monitorada a cada 24 horas recolhendo-se alíquotas de 0,2 mL, sendo posteriormente analisadas por CCD e CLAE-DAD.

3.3.3 Análise cromatográfica

A reação foi monitorada inicialmente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) por ser considerada uma técnica sensível, simples e rápida. Para as análises foram utilizadas cromatofolhas de alumínio sílica gel 60A (Merck®) como superfície adsorvente. Para eluição, diversas misturas de solventes foram testadas, a exemplo das misturas hexano/acetato em diferentes proporções e clorofórmio/metanol (8:2). No entanto, a mistura que separou de maneira mais satisfatória os componentes da amostra foi clorofórmio/metanol/água (8:2:0,3,v/v/v), corroborando com os resultados encontrados por Almeida (2011).

Além da reação, foram analisados também na camada delgada, os padrões da rotina e o óleo de mamona. Os produtos da reação foram visualizados com o auxílio de uma câmara cromatográfica com luz UV (254 nm) e por revelação química das placas com ácido sulfúrico (10%) em metanol (revelador universal), seguido de aquecimento a 80 °C. As alíquotas recolhidas ao longo das reações, após a filtragem, foram secas e ressuspenas em metanol para serem analisadas por Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplado com Detector de Arranjo Diodos (CLAE-DAD). A fase móvel foi composta por um gradiente de H₂O/H₃PO₄ 0.1% (A) e MeOH (B), sendo A:B (75:25) por 20 min, seguido de A:B (0:100) por 4 min e A:B (75:25) por 10 min. O fluxo da fase móvel foi mantido 1 mL/min e a temperatura da coluna a 30 °C.

3.3.4 Purificação e caracterização do produto de reação

Após o fim de cada reação a enzima foi removida por filtração. O meio resultante foi seco à temperatura ambiente. As reações foram monitoradas por

cromatografia em camada delgada. Um inconveniente encontrado foi à remoção do excesso de óleo presente no produto final, uma vez que, para favorecer a reação de esterificação, necessita-se de uma maior quantidade de agente acilante. As amostras foram então submetidas ao fracionamento preliminar em coluna aberta recheada com sílica 60A (Vetec) para purificar os ésteres obtidos a partir da reação de acilação enzimática. Foram utilizados solventes hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol, combinados em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas frações de aproximadamente 2 mL, as quais foram submetidas novamente à camada delgada, a fim de monitorar a separação.

Além da cromatografia em coluna, o fracionamento das amostras também foi realizado por cromatografia de filtração em coluna de Sephadex LH-20. O metanol foi o solvente utilizado como eluente. As frações recolhidas foram submetidas mais uma vez à camada delgada. As frações que apresentaram perfis semelhantes de mobilidade cromatográfica foram reunidas e submetidas a novo fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 com metanol para remoção do excesso de óleo da reação. Depois de secas, as frações coletadas foram ressuspensas em metanol para análise posterior por CLAE-DAD.

A estrutura química do produto purificado foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais e por cromatografia à líquidos/ Espectroscopia de massas (CLAE/EM).

3.4 Reação para verificação do rendimento reacional

Nesta etapa do experimento, seguimos a mesma metodologia utilizada no estudo preliminar de síntese de rutina ricinoleato usando lipase imobilizada, descrito no item 3.3.2.

Inicialmente, foram pesados os substratos da reação: cerca de 0,7 g de rutina e 2,1 g de óleo de mamona (agente acilante). A rutina e o óleo foram secos em dessecador com sílica gel sob vácuo por 7 dias (GAYOT *et al.*, 2003). Para o desenvolvimento da reação, os substratos foram solubilizados em 25 mL de acetona previamente seca (o processo de secagem da acetona também durou 7 dias e envolveu a adição de 6g de peneira molecular). Os substratos e a acetona foram então aquecidos a 40 °C por 5 minutos para garantir a solubilização completa dos componentes da reação. Posteriormente, 500 mg de lipase imobilizada foi adicionada ao meio, iniciando a

reação. Para manter a quantidade ótima de água no meio reacional, foram adicionadas 5g de peneira molecular (3Å).

A reação foi desenvolvida em estufa incubadora “shaker” de bancada, com agitação orbital de 80 rpm, à temperatura média de 50 °C, ao longo de 120 horas. O rendimento da bioconversão foi monitorado nos tempos 0, 24 e 120 horas recolhendo-se alíquotas de 1,0 mL, sendo posteriormente analisadas por CLAE-DAD.

3.4.1 Preparo da solução padrão de rutina

Para o preparo da solução padrão de rutina, pesou-se 15 mg do padrão de referência em um béquer de 50 mL, utilizando balança analítica e em seguida, adicionou-se metanol para a dissolução do flavonoide. Após completa dissolução, esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL avolumando com o metanol até a marca de aferição, a fim de obter uma solução com concentração final de 1,5 mg/mL.

3.4.2 Preparo da solução padrão do éster

Para o preparo da solução padrão do éster, quantidades exatamente pesadas de 222 mg da rutina ricinoleato obtida previamente em nosso laboratório, foram dissolvidas em metanol em balão volumétrico de 10 mL até a marca de aferição do balão, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 22,2 mg/mL. A solução padrão final foi preparada por diluição gradual da solução estoque, resultando na concentração final de 13,32 mg/mL.

Para obtenção das curvas de calibração e para validação do método analítico, as soluções da rutina e do éster utilizadas foram filtradas em membranas de 0,2 µm, e transferidas para vials de 1,5 mL.

3.4.3 Validação do método analítico

Para a quantificação do composto de interesse utilizou-se a metodologia do padrão externo, que é baseada na construção de uma curva de calibração a partir de soluções padrões de concentrações conhecidas da rutina e do éster. Na validação do método analítico utilizado para quantificação de rutina e de rutina ricinoleato, os seguintes

parâmetros foram determinados: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). O método proposto foi validado segundo os critérios do International Conference on Harmonization (ICH, 2005).

3.5 Avaliação de citotoxicidade em células Vero

3.5.1 Cultivos de células

As células da linhagem Vero, provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram mantidas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro fetal equino e antibióticos (100 UI/mL penicilina G, 100 mg/mL estreptomicina) a 37 °C em incubadora de CO₂. As células foram cultivadas em frascos de cultivo com 25 cm² contendo 5 mL de meio, que foi substituído três vezes por semana.

3.5.2 Tratamentos dos cultivos de células

As células foram distribuídas em microplaca de 96 poços (3,5 x10⁴ células/poço). Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, o meio do cultivo foi removido e adicionado a rotina ricinoleato diluído em DMSO 0,01% (Dimetilsulfóxido) e meio RPMI. As concentrações utilizadas para o éster no teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenitetrazólio) foram 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL. Sob as mesmas condições de incubação, após 24 horas do tratamento foi realizado o teste de MTT. Nos poços controles foram utilizadas apenas células não tratadas.

Todos os procedimentos foram realizados em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar. Como os reagentes são conservados a 4°C, todos foram aquecidos previamente até 20 °C para evitar o estresse celular provocado pela diferença de temperatura.

3.5.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenitetrazólio (MTT) segundo Hansen, Nielsen, Berg (1989), baseado no princípio da conversão do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas em cristais de

formazan de cor violácea. As células foram expostas ao éster por 24 horas, e após este período, o meio de cultura foi removido e adicionado aos poços 100 µL de solução de MTT em meio RPMI (1 mg/mL). Após três horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados 100 µL/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS (duodecil sulfato de sódio) e 50% de DMF (dimetil formamida) (pH=4,7), mantendo-se as placas por 12 horas a 37 °C. A absorbância óptica foi medida utilizando leitor de placas de comprimento de onda (405 -600 nm). Foram realizadas três repetições com cinco replicatas para cada concentração e controle. Os resultados foram apresentados como o percentual de viabilidade celular (média e desvio padrão) em relação ao controle, considerado como 100%.

3.5.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos da avaliação citotóxica foram analisados pela ANOVA seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 5%, através do programa GraphPad Prism (versão 5.0).

3.6 Atividade antioxidante

3.6.1 Determinação da atividade antioxidante por DPPH•

Para avaliar a atividade antioxidante do éster foi utilizado o método de capacidade de captura *in vitro* do radical livre DPPH• (2,2, difenil-2-picrilhidrazil), seguindo a metodologia de Brand-Williams *et al.* (1995) e Kim *et al.* (2012), com modificações. O comprimento de onda utilizado foi de 492 nm. Para efeitos de comparação, o ensaio também foi realizado com o padrão de rutina pela atividade antioxidante reconhecida pela literatura.

A solução padrão de DPPH• (0,06 mM) foi preparada dissolvendo-se 4 mg de DPPH• em metanol e completando-se o volume para 50 mL. A solução foi transferida para um vidro âmbar devidamente etiquetado. A solução foi preparada e utilizada no mesmo dia da análise.

A Solução padrão da amostra e da rutina foram preparadas inicialmente na concentração de 100 µg/ml. Pesou-se 0,1 mg de amostra e do antioxidante padrão (rutina) e diluiu-se em 10 mL de etanol.

A partir dos padrões, as amostras foram preparadas na concentração de 50 µg/ml. A cada poço adicionou-se 20 µL das amostras, em concentrações de 50 µg/ml

para reagir com 80 μL da solução de DPPH•. O branco foi feito usando 20 μL das concentrações das amostras citadas com 80 μL de metanol. A leitura foi efetuada depois de 10 minutos, mantendo-se a placa em um ambiente escuro à temperatura de 22°C. Todas as análises foram realizadas em triplicada. O controle negativo foi feito em três repetições, colocando-se 20 μL de metanol e 80 μL de DPPH•, a leitura foi realizada imediatamente após o período de incubação da reação.

Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de redução em uma dada concentração. A porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL) foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde A_c é igual a absorbância do controle, A_a é a absorbância das amostras:

$$\%SRL = 100 \times [(A_c - A_a) / A_c]$$

3.6.2 Teste de Inibição da Auto-oxidação do beta-caroteno

O teste foi executado segundo o protocolo estabelecido por Hidalgo *et al.*, 1994 com adaptações. Uma mistura reacional foi preparada utilizando-se 1 ml de solução de beta-caroteno (0,2mg/mL em clorofórmio), 20mg de ácido linoleico e 200 mg de tween 60 (emulsificador). A mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio (CHCl_3) e então foi adicionado 90 mL de água destilada, agitando-se vigorosamente para promover a aeração. Amostras a serem testadas foram preparadas a 100 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 20 μL das amostras e 250 μL da mistura reacional foram adicionadas à microplaca para a leitura em aparelho Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer a 470 nm. A atividade antioxidante foi medida através do efeito da substância testada em triplicata sobre a degradação da absorção do caroteno durante 120 minutos, utilizando-se a fórmula a seguir. As atividades obtidas foram comparadas com aquelas apresentadas por antioxidantes naturais: rutina e quercetina. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da auto-oxidação do betacaroteno.

$$AA = 100 [1 - (A_{m_0} - A_{m_t}) / (A_{c_0} - A_{c_t})]$$

Onde, A_{m_0} = Absorbância inicial da amostra

A_{m_t} = Absorbância final da amostra

A_{c_0} = Absorbância inicial do controle

A_{c_t} = Absorbância final do controle

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grande interesse por produtos naturais, como por exemplo, os compostos fenólicos de plantas, deve-se especialmente as propriedades biológicas dos mesmos. Por conta destas propriedades, diversas pesquisas têm contribuído para a descoberta de novas moléculas que desempenham importantes papéis nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos (KHAN; RATHOD, 2015).

Muitas pesquisas têm investigado a modificação estrutural destes compostos no intuito de melhorar, não apenas as características fisio-químicas, mas também a relação estrutura atividade. Para este fim, transformações biocatalíticas envolvendo enzimas imobilizadas têm sido aplicadas em diversos trabalhos científicos com sucesso (PLAZA *et al.*, 2014).

As reações de biocatálise têm substituído muitas transformações químicas convencionais, já que as primeiras são mais seletivas além de permitir o melhor isolamento dos produtos finais. As reações enzimáticas envolvendo lipases isoladas de fungos têm sido utilizadas com êxito na obtenção de derivados glicosilados lipofílicos. O uso de enzimas em meios não aquosos favorece a reação de síntese ao invés de hidrólise, além de permitir a acilação seletiva apenas na porção glicosídica da molécula, preservando o núcleo flavonoide. A lipase B de *Candida antarctica* em sua forma imobilizada tem sido amplamente utilizada na acilação enzimática de flavonoides glicosilados, já que a imobilização pode facilitar além da regioseletividade, a recuperação do produto final (CHEBIL *et al.* 2006) .

A escolha do solvente, bem como a secagem dos componentes reacionais, são passos importantes a ser considerados. A natureza do solvente utilizado pode interferir na atividade e na estereosseletividade enzimática. A secagem dos reagentes da reação pode ser feita através da adição de peneiras moleculares ao meio (KATZOURA *et al.* 2006).

As condições reacionais utilizadas no presente trabalho, bem como o método de secagem dos constituintes da reação, foram obtidas de trabalhos científicos descritos na literatura e serão discutidos a seguir.

Diversos estudos envolvendo a esterificação de flavonoides glicosilados têm sido descritos na literatura. Nestas reações, diferentes substratos e numerosos sistemas

de solventes orgânicos têm sido investigados, como também a temperatura ótima em que se desenvolve a reação. A escolha da temperatura da reação influencia na cinética da biocatálise e depende do tipo de enzima e solventes utilizados.

A lipofilização da rutina já está bem estabelecida na literatura. Algumas condições reacionais utilizadas na esterificação da rutina com lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) podem ser vistas na tabela 2.

Tabela 2: Condições reacionais utilizadas na esterificação de rutina

Agente acilante	solvente	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	Referência
ácido esteárico	tert-amyl álcool	60	46	Duan <i>et al.</i> , 2006
ácido oléico			70	
Ácido linoléico			80	
Etil linoleato	acetona	50	50	Mellou <i>et al.</i> , 2006
Acido γ -linolênico			68	
Acido oleico			70	
Acido γ -linolênico	acetona	50	68	Xanthakis <i>et al.</i> , 2010
Acido linoleico			80	
Ácido octanoico			18	
Acido decanoico	acetona		24	
Acido dodecanoico			25	
Ácido octanoico			15	
Acido decanoico	Terc-butanol		25	
Acido dodecanoico		45	18	Kantogianni <i>et al.</i> , 2003
Ácido octanoico			10	
Acido decanoico	Sem solvente		15	
Acido dodecanoico			3	
Ácido octanoico			2	
Acido decanoico	THF		2	
Acido dodecanoico			5	
Vinil butirato	[bmim]BF ₄	60	51	Katsoura <i>et al.</i> , 2006

THF: tetrahidrofurano; [bmim]BF₄: 1-butil-3-metilimidazolium tetrafluoroborato

Muitos estudos discutem os parâmetros que afetam a performance das reações de acilação enzimática de flavonoides glicosilados. Além da seleção da enzima, a natureza dos substratos empregados como agentes acilantes nas reações de esterificação da rutina, pode afetar não apenas o rendimento, mas também as propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos gerados. Kontogianni *et al.* (2003) descreveram a esterificação da rutina com os seguintes ácidos graxos saturados: ácido octanóico (C8), decanóico (C10) e dodecanóico (ácido caprílico, cáprico e láurico, respectivamente). No estudo, nenhuma relação pode ser estabelecida entre o tamanho da cadeia do doador de acila e o rendimento da conversão, provavelmente pela pequena diferença de tamanho das cadeias dos substratos envolvidos. No entanto, Ardhaoui *et al.* (2004), estudaram a acilação da rutina com ácidos graxos saturados, com diferentes comprimentos de cadeias (variando de C6 a C18) e verificaram maiores rendimentos reacionais para o ácido láurico (C12), ácido palmítico (C16) e ácido esteárico (C18). Resultados semelhantes foram encontrados por Mellou *et al.* (2006) e Xanthakis *et al.* (2010) que obtiveram rendimentos reacionais acima de 70% quando foram empregados os ácidos oleico (C18) e linoleico (C18).

Além de influenciar no rendimento reacional, o tamanho da cadeia do doador de acila também pode afetar a regioseletividade da lipase. Estudos apontam que a regioseletividade da CAL B pode ser melhorada com o aumento do tamanho da cadeia do ácido graxo, resultando na formação de derivados monoacilados. (KONTOGIANII *et al.*, 2003).

Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo diferentes ácidos graxos como substratos para reações de acilação da rutina, nenhum estudo foi descrito na literatura acerca da esterificação deste flavonoide com óleo de mamona. O ácido ricinoléico, componente majoritário do óleo, consiste em um ácido graxo de cadeia longa (C18), monoinstaurado (dupla ligação no carbono 9) e como já citado anteriormente, apresenta uma hidroxila altamente reativa no carbono 12, o que propicia uma variedade de reações, destacando-se entre elas, a esterificação (CHIERICE E CLARO NETO, 2001). Além da importância econômica já evidenciada pela larga aplicação industrial, pesquisas envolvendo o óleo de mamona contam com a vantagem que a planta é extremamente adaptada ao solo do Brasil, podendo ser cultivada em qualquer região do país, com destaque à produção na região nordeste (CONAB, 2015), o que garante a oferta, reduz custos e valoriza o produto nacional.

Como descrito anteriormente, além dos substratos, a natureza do solvente empregado é outro importante fator a ser considerado nas reações de acilação envolvendo CAL B. Solventes de moderada polaridade como o THF (Tetrahidrofurano) e a acetona são considerados adequados para a acilação regioseletiva de flavonoides (LI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2007). Em experimentos envolvendo acilação enzimática da rutina, maiores percentuais de conversão foram obtidos quando a acetona e o terc-butanol foram utilizados em comparação ao THF que se mostrou incompatível com a lipase nas condições testadas (KONTOGIANNI *et al.* 2003)

Estudos posteriores avaliaram a esterificação da rutina frente a solventes orgânicos como acetonitrila, acetona e 2-metil-2-butanol. Segundo os autores, a acetona exibiu maior rendimento reacional, com percentual de conversão de aproximadamente 70% (MELLOU *et al.*, 2006). Em diversos estudos, a acetona foi escolhida ao invés de solventes tóxicos, porque além de não desnaturar a lipase, permitiu a solubilização adequada dos componentes das reações, sendo considerada, portanto, um eficiente solvente na conversão enzimática da rutina.

Nas reações de esterificação, além dos substratos e solventes, a temperatura reacional deve ser também cuidadosamente selecionada para garantir o desenvolvimento da biocatálise e manter ótima a atividade enzimática. Em experimentos envolvendo lipase, as reações foram desenvolvidas à temperatura de 50°C, permitindo a solubilização efetiva dos reagentes, com elevado percentual de conversão da rutina nos respectivos produtos reacionais (XANTHAKIS *et al.*, 2010; MELLOU *et al.*, 2006).

Após a busca por condições de lipofilização, a rutina foi esterificada segundo metodologia utilizada por ALMEIDA *et al.* (2012) com algumas modificações.

A obtenção do éster está descrita na figura 6.

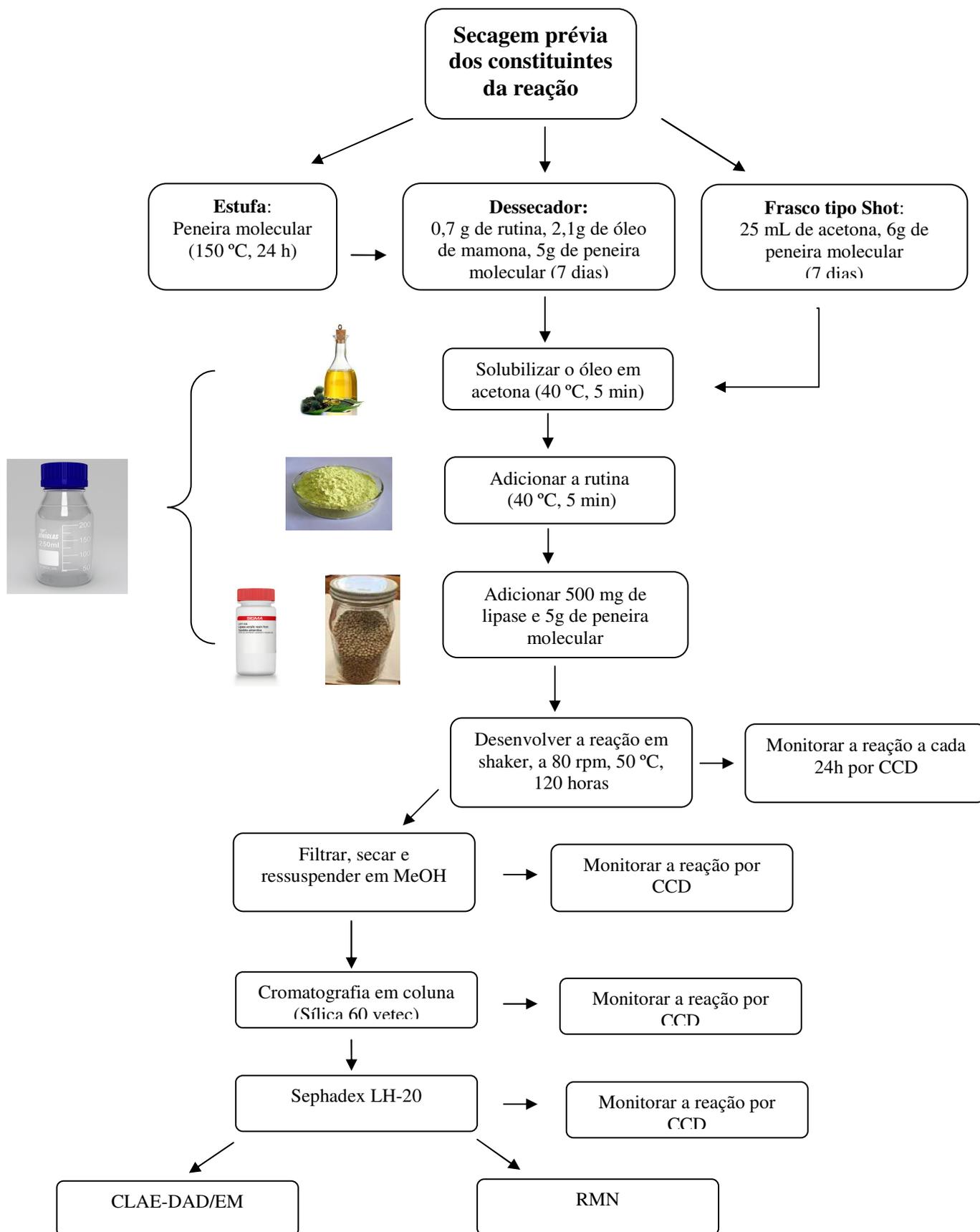


Figura 6. Fluxograma para obtenção, purificação e determinação estrutural da rutina ricinoleato

4.1 Obtenção da rutina ricinoleato

A obtenção do éster seguiu a metodologia detalhada no item 3.3 deste trabalho. A etapa inicial consistiu na secagem de todos os componentes da reação. Após o período de secagem, os substratos foram solubilizados com a acetona e então a lipase imobilizada foi adicionada ao meio para iniciar a reação de transesterificação.

A secagem dos constituintes da reação consiste em uma etapa fundamental para a conversão enzimática da rutina, considerando que a quantidade de água na reação é crucial para o sucesso da esterificação. O excesso de água leva a redução da conversão com queda no rendimento da reação porque a água pode competir com os grupos hidroxila da rutina e hidrolisar os compostos intermediários formados durante a esterificação. Além disso, o conteúdo de água ao redor da enzima reduz a rigidez da mesma por formar ligações de hidrogênio e permitir a exposição do sítio ativo enzimático. Por outro lado, a perda da hidratação leva a uma redução da atividade da lipase (GAYOT *et al.*, 2003).

No sentido de manter a quantidade ótima de água no meio reacional e viabilizar a formação do éster, foram adicionadas à reação e ao solvente, as peneiras moleculares, um dessecante que atua por absorção. As chamadas zeólitas ou peneiras moleculares são consideradas os melhores agentes dessecantes para a maioria dos solventes utilizados em reações químicas e são apropriadas para cada tipo de solvente. São aluminossilicatos naturais ou sintéticos que possuem numerosos canais internos com tamanhos definidos (FERREIRA, 1992).

Após o período de 120 horas, a reação foi monitorada primariamente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A análise da placa indicou a formação de um produto com polaridade intermediária entre a rutina e o óleo, identificado posteriormente como o éster formado. Em virtude do excesso de óleo presente no meio, as amostras foram submetidas ao fracionamento preliminar em coluna aberta recheada com sílica, seguida de cromatografia de filtração em coluna de Sephadex LH-20 e as frações recolhidas foram submetidas novamente à camada delgada, a fim de monitorar a separação. Depois de secas, as frações coletadas foram reunidas de acordo com os perfis apresentados na camada delgada e nomeadas como RU1, RU2, RU3 e RU4, as quais foram posteriormente analisadas por CLAE-DAD.

As técnicas cromatográficas são utilizadas para separar os constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação ou obtenção da substância pura, sendo empregadas para a investigação química dos extratos brutos e caracterização dos metabólitos secundários de interesse (STREGE, 1999). As técnicas espectroscópicas são utilizadas para a identificação estrutural destas moléculas.

A cromatografia a líquidos de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos (CLAE-DAD) consiste em um importante método de investigação de perfil químico de metabólitos de plantas. Neste tipo de cromatografia são empregadas pequenas colunas recheadas com diferentes tipos de suporte e uma fase móvel que é eluída sob pressões elevadas. Normalmente, os suportes mais usados para separar compostos lipofílicos são à base de gel de sílica o óxido de alumínio. Para separação de substâncias hidrofílicas como açúcares e aminoácidos, podem ser usados celulose, poliamida e géis de dextrano (CARDOZO *et al.*, 2011).

A associação com detectores de diodo permite a seleção do melhor comprimento de onda, para cada componente da amostra. Trata-se de um método simples e rápido que pode ser utilizado para análise de pequenas quantidades de amostras, permitindo avaliar o perfilamento de poucas gramas de extratos ou de amostras vegetais em curto espaço de tempo (ABREU, 2010). Os limites de detecção alcançados na técnica são a níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. O método permite também a realização de análises comparativas entre extratos submetidos a diferentes condições de cultivo. (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2005).

A técnica de CLAE-DAD é amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas avaliando o efeito de diferentes solventes orgânicos utilizados na extração dos compostos (CARDOZO *et al.*, 2011). A CLAE pode ser utilizada para a purificação dos compostos usando solventes, como metanol e água (LI *et al.*, 2010).

A CLAE é considerada uma excelente técnica analítica com capacidade de separação de até 100 componentes em uma amostra (COLLINS *et al.*, 2006). É o método mais frequentemente utilizado na investigação de flavonoides, através da espectrofotometria na faixa de absorção ultravioleta-visível (UV). Geralmente, o comprimento de onda utilizado para a análise destes compostos é 280 nm. Os espectros de absorção no UV são determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois picos máximos de absorção entre 240 e 285 nm e outro entre 300 e 400 nm, referentes às bandas II e I respectivamente. Geralmente a banda II está relacionada ao anel A e a banda I ao anel B (SANTOS, 2006).

Os compostos presentes na amostra foram avaliados de acordo com os cromatogramas e os espectros de absorção no UV, que foram impressos e comparados visualmente. O cromatograma do padrão da rutina mostrou pico majoritário com tempo de retenção em 11,74 minutos, compatível com os dados da literatura (Figura 7).

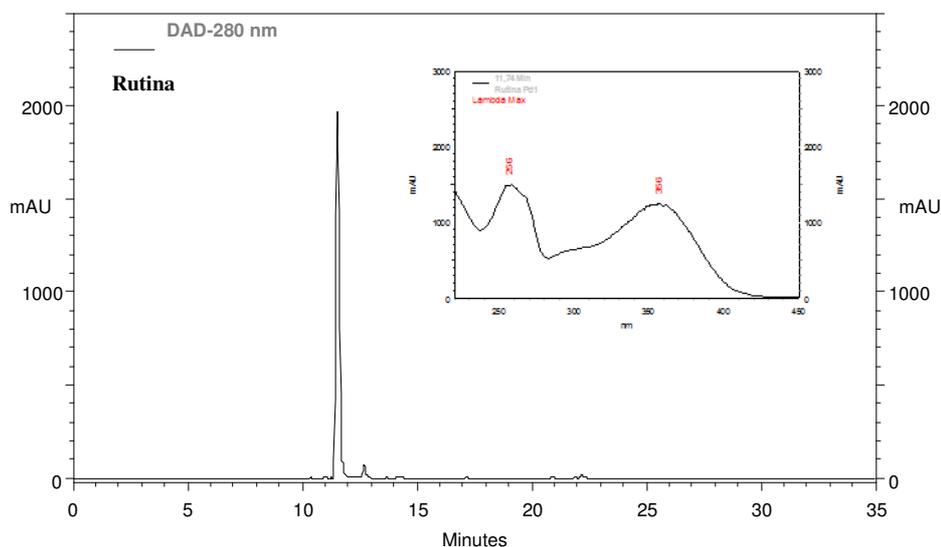


Figura 7. Cromatograma e espectro de UV do padrão de rutina

As análises espectroscópicas dos picos eluídos nos cromatogramas sugerem que as substâncias apresentam cromóforos semelhantes, apesar dos diferentes tempos de retenção demonstrados. O éster formado ficou mais tempo retido na coluna, que foi em média 20,9 minutos, provavelmente pela longa cadeia de carbono ligados à rutina. O mesmo perfil foi observado em todas as frações avaliadas: RU1, RU2, RU3 e RU4. A figura 8 mostra o cromatograma da fração RU1.

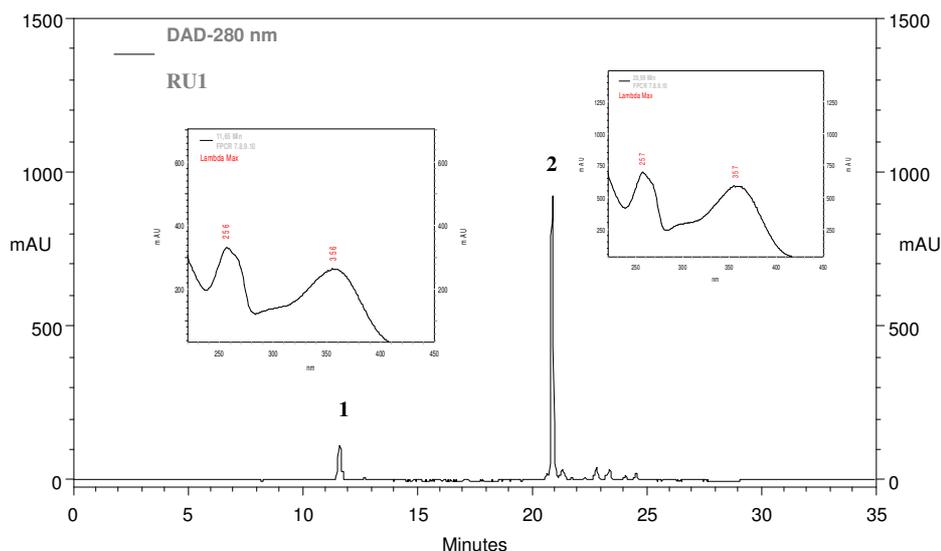


Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da reação de acilação enzimática da rutina com óleo de mamona- Fração RU1 (1: rutina e 2: éster formado durante a reação).

A etapa seguinte seria a realização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a elucidação estrutural do éster. No entanto, o excesso de óleo presente no meio reacional inviabilizou a análise por este método, sendo necessário purificar previamente o composto.

Como os perfis cromatográficos apresentados nas frações foram os mesmos, apenas uma fração (RU1) foi submetida à nova cromatografia. Na sequência, a amostra foi solubilizada em metanol, sendo então, recromatografada em coluna aberta usando Sephadex LH20.

O Sephadex consiste em um polímero modificado de dextrano (gel de dextrano hidroxipropilado) no qual macromoléculas apresentam ligações de hidrogênio entre as cadeias, formando uma estrutura tridimensional porosa, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos (COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia por Sephadex é considerada uma excelente técnica para o fracionamento de compostos lipídicos e tem sido também empregada para o pré fracionamento de compostos fenólicos. O mecanismo de separação usando sephadex é baseado não somente na exclusão por tamanho da partícula, mas também em mecanismos de adsorção e particionamento os quais ocorrem sobre a superfície do gel. Uma das principais vantagens desta técnica consiste na utilização de solvente puro e volátil como fase móvel e também na alta capacidade de carga (HENKE, 1995). A técnica foi especialmente desenvolvida para a filtração de produtos naturais. No

presente estudo, a cromatografia por Sephadex se mostrou uma alternativa efetiva para a remoção do excesso de óleo presente no meio reacional, onde a maior parte do óleo presente na fração ficou retida na parte superior da coluna.

Após a recromatografia, a nova fração obtida foi submetida à análise por CLAE-DAD. A figura 9A mostra o cromatograma da rotina com tempo de (Rt) 11.57 min e espectros de UV λ_{\max} 257, 357 nm (Figura 9-A1). A figura 9B mostra o perfil de cromatograma do produto da reação que contém 2 picos: rutina (1) a 11.57 min e o ester formado (3) a 22.8 min. Ambos os picos mostram os respectivos espectros de UV, porque a acilação do flavonoide não desloca as bandas de absorção no espectro de UV.

A estrutura química do produto purificado foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais e por cromatografia à líquidos/ Espectroscopia de massas (CLAE/EM).

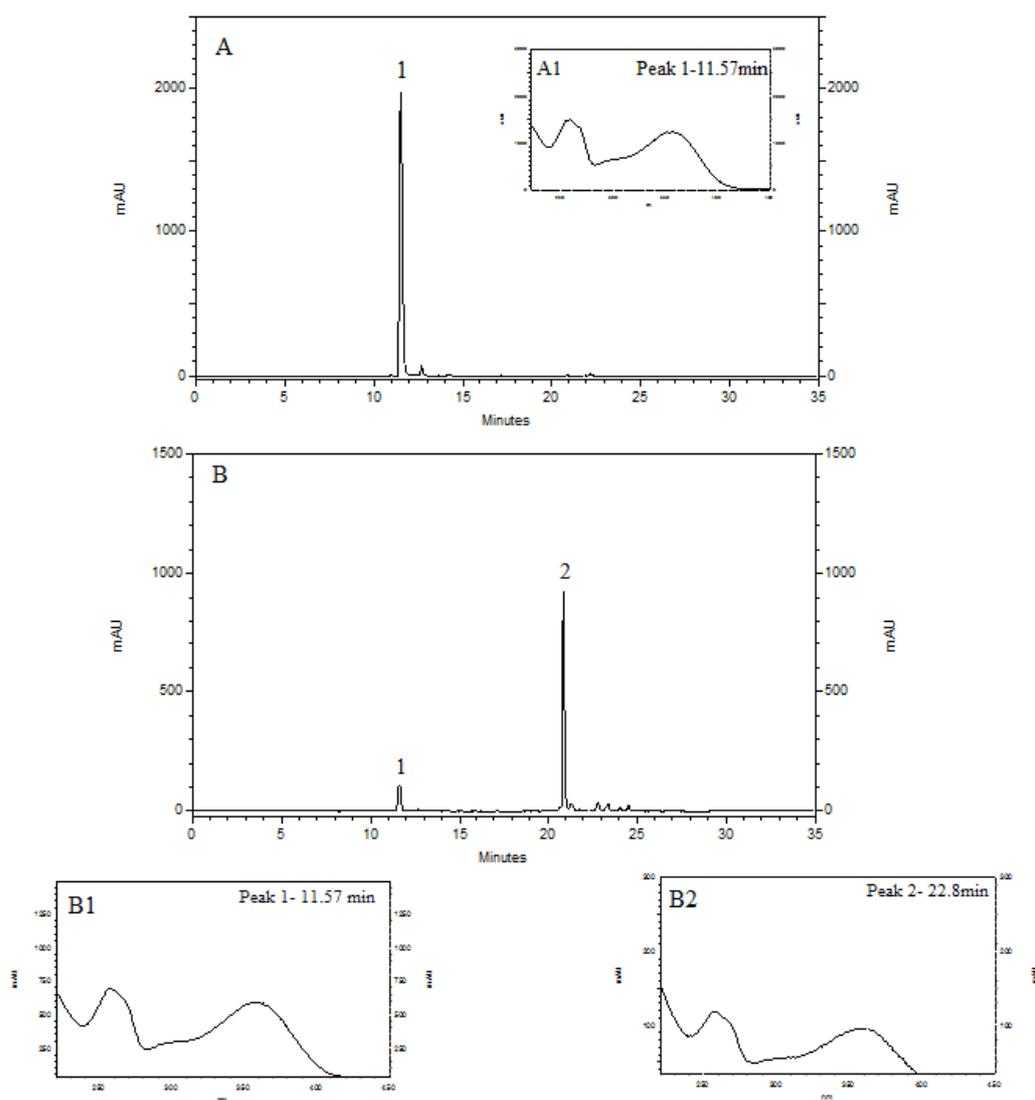


Figura 9: Cromatograma da reação de acilação, análise por HPLC

4.2 Determinação estrutural da rutina ricinoleato

Muitas pesquisas têm sido dedicadas à elucidação estrutural de flavonoides através da espectrometria de massas, uma técnica analítica eficiente para detectar e identificar moléculas através da medição da massa e caracterização química destes compostos (CUYCKENS, F.; CLAYES, M. 2004). A polaridade destes compostos exerce um papel fundamental na escolha da técnica cromatográfica e a espectrometria de massas tem se mostrado uma técnica efetiva na identificação de flavonoides (GODOY *et al.*, 2012).

A espectrometria de massas consiste em das mais importantes técnicas de análise molecular devido ao potencial de fornecer informações relativas à estrutura e a massa molar do analito. A técnica tem se mostrado uma excelente ferramenta para a identificação de metabólitos provenientes de produtos naturais como os flavonoides (SALDANHA *et al.*, 2013).

Após a purificação por Sephadex LH-20, a rutina-*O*-ricinoleato foi isolada e caracterizada por cromatografia líquida/espectroscopia de massas (LC/MS) (Figura 10). O cromatograma por LC-MS mostra um intenso pico a 23.9 minutos que tem MS full no modo positivo com padrão de fragmentação 891 [M+H]⁺ referindo que a molécula protonada de rutina-*O*-ricinoleate é o aduto de sódio com massa de 913 [M+Na]⁺ e a massa de 745 [M-146+H]⁺ este fragmento corresponde a perda de 146 Da para rhamnose, o açúcar terminal da rutina.

O MS2 de 891 [M+H]⁺ mostra os seguintes fragmentos: 465 [M-146-280+H]⁺, este fragmento corresponde a perda da unidade de açúcar rhamnose com 146 Da e a porção referindo ao ácido ricinoleico (280 Da) e 303 [M-146-280-162+H]⁺, o fragmento mais intenso mostra a quercetina aglicona. A perda simultânea da rhamnose e a unidade ricinoleato indica que a acilação ocorreu na unidade de açúcar.

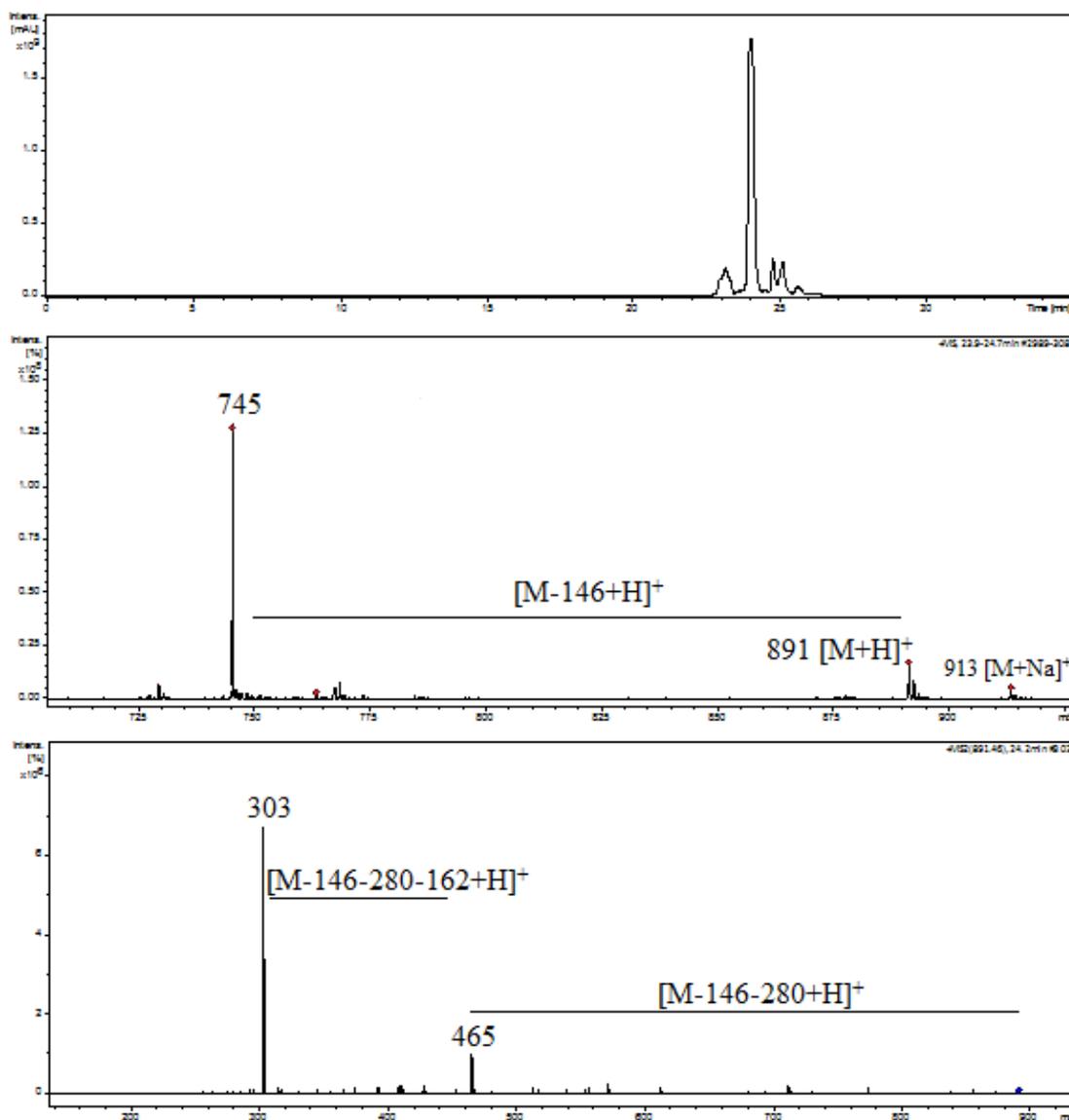


Figura 10: Isolamento e caracterização da rutina-*O*-ricinoleato por cromatografia líquida/espectroscopia de massas (LC/MS)

Para a análise da estrutura química do produto da reação, procedeu-se à avaliação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais. As figuras 11 e 12 mostram os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da rutina e seu éster, respectivamente. As respectivas expansões são mostradas em anexo.

A técnica consiste em uma das mais importantes ferramentas para a elucidação estrutural de compostos orgânicos, colaborando para a determinação do esqueleto da molécula. Para isto, as amostras foram submetidas a um campo magnético externo de maneira que os núcleos de massa ímpar pudessem entrar em ressonância com a

radiofrequência usada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo. A interpretação dos espectros de RMN possibilita caracterizar o número e o tipo de átomos de carbono (C) e hidrogênio (H), em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (ARAUJO, 2013).

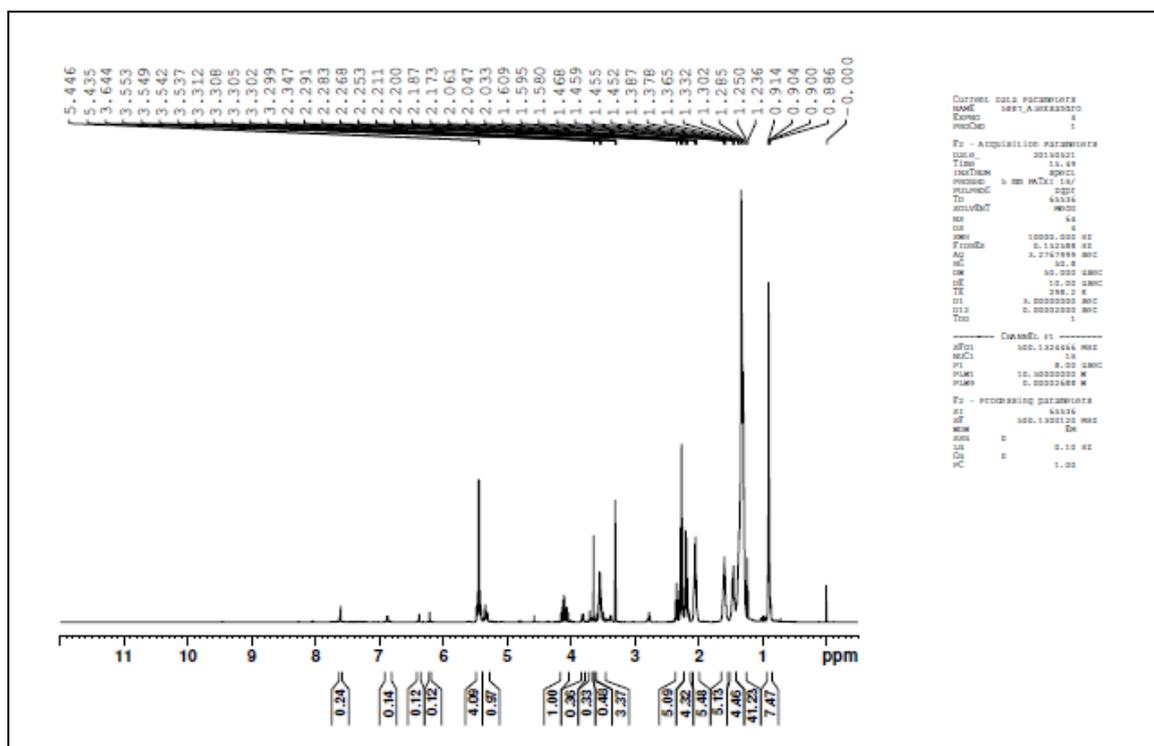


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)

caracterizada como ramnose devido a presença de hidrogênios metílicos em δ_H 1,22 (d, $J=6,2$; H-6’’’).

O espectro de RMN de 1H apresentou ainda sinais característicos de ácido graxo monoinsaturado de cadeia longa. O sinal em δ_H 0,88 (3H,t, $J=5,9$; H-18), corresponde ao grupo metila terminal. Os sinais entre δ_H 1,28 e 1,47 correspondem às absorções de grupos metilenos de cadeias longas. O hidrogênios olefínicos foram detectados em δ_H 5,43 (1H,m, H-9’’’’’) e em δ_H 5,45 (1H,m, H-10’’’’’). Não foram detectadas mudanças significativas nos sinais químicos referentes aos prótons do flavonoide.

No espectro de RMN de ^{13}C foram encontrados a presença de 42 sinais, dos quais 27 correspondem à rutina e 15 sinais correspondem somente à unidade aglicona. Dentre estes, se destaca o sinal em δ_C 177,97 ppm que corresponde ao carbono carbonílico C-4. Foram encontrados também os sinais em δ_C 102,3 e ppm δ_C 103,9 ppm característicos para carbonos anoméricos de duas unidades glicosídicas. Verificou-se também um sinal de carbono metilênico em δ_C 66,6 ppm indicando a presença da molécula de glicose. Apesar de não ter sido detectado o sinal de carbono metílico que aparece na faixa de δ_C 18,0 ppm, os demais sinais na faixa de δ_C 61,51 a 78,29 ppm detectados sugerem a presença das unidades glicosídicas glicose e ramnose.

No espectro HMQC foi possível observar as correlações diretas entre δ_H 6,21(H-6) com δ_C 99,5(C-6), δ_H 6,39 (H-8) com δ_C 99,8 (C-8), δ_H 7,62 (H-2’) com δ_C 117,6 (C-2’), δ_H 6,87 (H-5’) com δ_C 116,1 (C-5’), δ_H 7,61 (H-6’) com δ_C 123,5 (C-6’), corroborando com dados encontrados em outros estudos (ARAUJO, 2013). Além Disso, os dados espectrais demonstraram ainda os sinais δ_H 5,29 (H-1’’) com δ_C 104,7 (C-1’’), e δ_H 4,16 (H-1’’’) com δ_C 102,4 (C-1’’’) que contribuíram para identificar os açúcares da molécula.

Como mostrado na tabela 3, os sinais químicos de C4’’ e do C3’’ da molécula de glicose da rutina ricinoleato são semelhantes àqueles obtidos para a rutina. Não houve mudança significativa entre os sinais do C4’’’ da molécula de ramnose da rutina e da rutina ricinoleato. Neste sentido, os dados espectrais sugerem que a acilação ocorreu na hidroxila secundária (4’’’-OH) da molécula de ramnose. Após análise dos dados, os resultados sugerem que a acilação da molécula de rutina (1) com o ácido ricinoléico (2), resultou na obtenção de um produto majoritário, monoacilado, a rutina-*O*-ricinoleato (3) (C₄₅H₆₂O₁₈) (Figura 13).

Tabela 3. Comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (500 MHz) para a fração RU1 em MeOD (δ em ppm e J em Hz), com os dados da rutina da literatura* (MeOD, 75 MHz)

Posição	Rutina (MeOD 75 MHz)				Éster Rutina (MeOD 500 MHz)				
	C/H	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC	
		δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	159,3	-		H-2',H-6'	159,16	-		H-2';H-6'	
3	135,6	-		H-1''	132,86	-			
4	179,4	-			177,97	-			
5	162,9	-	H-6		161,8	-			
6	99,5	6,19 (d, $J=2,1$)		H-8	100,08	6,21 (d, $J=2,0$)			
7	166,0	-	H-8,H-6		165	-			
8	94,8	6,39 (d, $J=2,1$)		H-6	94,9	6,39(d, $J=2,0$)			
9	158,5	-	H-8		158,64	-			
10	105,6	-		H-6,H-8	105,78	-		H-6';H-8'	
1'	123,1	-	H-2',H-6'	H-5'	123,23	-			
2'	117,6	7,66 (d, $J=2,1$)		H-6'	117,6	7,62 (d, $J=2,1$)			
3'	145,8	-	H-2'	H-5'	146,17	-			
4'	149,8	-	H-5'	H-2',H-6'	149,9	-		H-2';H-6'	
5'	116,1	6,86 (d, $J=8,4$)	H-6'		116,17	6,86 (d, $J=8,4$)			
6'	123,5	7,61 (dd, $J=2,1$ e 8,4)	H-5'	H-2'	123,58	7,61 (dd, $J=2,1$ e 8,4)			
1''	104,7	5,1(d, $J=7,5$)			103,92	5,29(d, $J=7,4$)			
2''	75,7	3,43 (s)	H-3''	H-4''	75,20	3,43 (m)			
3''	78,1	3,41 (s)	H-2'',H-4''	H-5''	78,29	3,41 (m)			
4''	72,2	3,62 (d, $J=1,8$)	H-3'',H-5''	H-6'''	72,57	3,62 (m)			
5''	77,2	3,27 (s)			77,07	3,36 (m)			
6''	68,6	3,78/3,30 (m)	H-5''	H-1''',H-4'''	66,62	3,71(d, $J=10/3,30$ (m)			
1'''	102,4	4,51 (d, $J=1,5$)			102,29	4,16 (d, $J=1,3$)			
2'''	71,4	6,19 (d, $J=2,1$)	H-3'''		72,37	3,36 (dd, $J=1,3;3,3$)			
3'''	72,1	3,26 (d)	H-2'''		67,65	4,51 (d, $J=3,3;9,5$)			
4'''	73,9	3,52 (d, $J=3,3$)	H-3'',H-5''	H-2''',H-6'''	74,00	3,36 (m)		3H-6'''	
5'''	69,7	3,46 (s)		H-1'''	65,78	3,47 (m)	3H-6'''		

6''''	17,9	11 (d, J=6,0)	H-5''	H-4''''	17,3	1,22 (d, J=6,2)		
1''''	-	-			175,53		2H-2''''	2H-3''''
2''''	-	-			33,16	2,17(m)		
3''''	-	-			26,28	1,47(m)	2H-2''''	
4 a7''''	-	-			28,27 a	1,24-1,43		
					28,50			
8''''	-	-			28,54	2,03		
9''''	-	-			131,07	5,43	2H-8''''	2H-11''''
10''''	-	-			127,05	5,45	2H-11''''	2H-8''''
11''''	-	-			35,08	2,06(t)		
12''''					71,29	3,5		
13''''	-	-			36,44	1,56		2H-11''''
14''''	-	-			23,94	1,28		
15''''					30,34	1,28		
16''''	-	-			32,82	1,28		3H-18''''
17''''	-	-			23,71	1,28	3H-18''''	
18''''	-	-			14,60	0,88(t)		

* VANDRESSEN, 2005

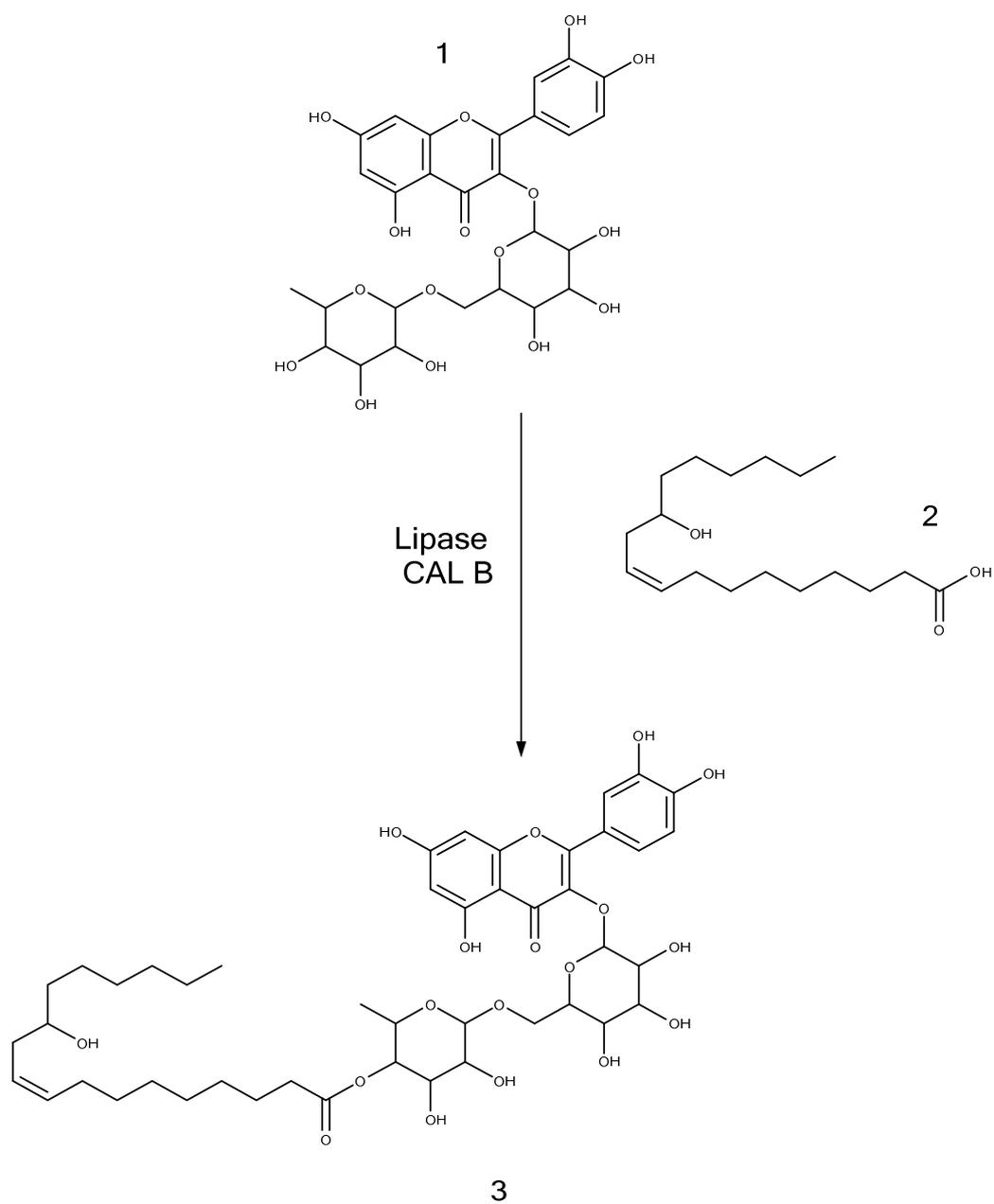


Figura 13: Esterificação da rutina (1) com ácido ricinoléico (2) resultando na obtenção de rutina-*O*-ricinoleato (3)

4.3 Quantificação da rutina ricinoleato por cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD)

4.3.1 Otimização do método analítico

Neste estudo, as condições do HPLC foram ajustadas a fim de quantificar, simultaneamente, a rutina e a rutina ricinoleato. Foram testados diferentes gradientes de solventes e os melhores resultados foram obtidos utilizando fase móvel composta por um gradiente de H₂O/H₂PO₄ 0,1% (A) e MeOH (B), sendo de 0-12 min A:B (80:20), de 13-18 min A:B (30:70), de 19-25 min A:B (0:100), de 26-30 min A:B (0:100), de 31-32 min A:B (80:20) e de 33-35 min A:B (80:20). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1 mL/min e a temperatura da coluna a 30 °C.

Os cromatogramas das figuras 14 e 15 demonstram que o método analítico desenvolvido apresentou boa resolução para os picos da rutina do éster. Os tempos de retenção da rutina e do éster nas análises cromatográficas foram de aproximadamente 15 e 28 minutos, respectivamente. Os compostos analisados foram identificados e quantificados por comparação com os padrões de referência da rutina e do éster através dos tempos de retenção e espectros de UV destes compostos. Com o emprego do DAD, foi possível obter os espectros de UV (200-400 nm) de cada pico, o que permitiu a seleção de um comprimento de onda adequado no intuito de maximizar a detecção dos constituintes, sendo que para registro dos cromatogramas, o comprimento de onda escolhido foi de 280 nm.

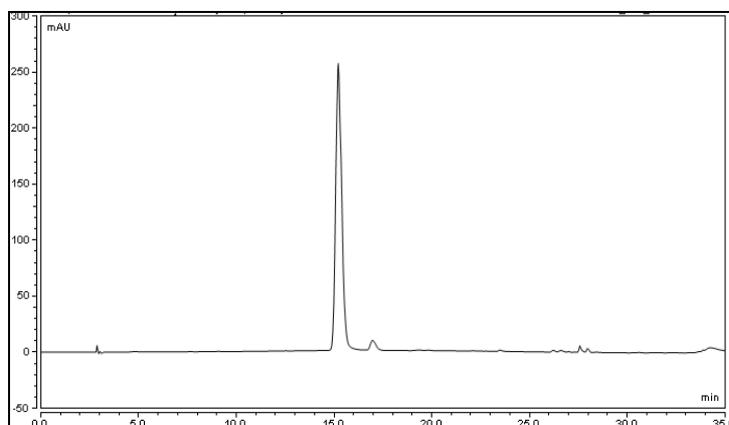


Figura 14. Cromatograma da solução padrão de rutina

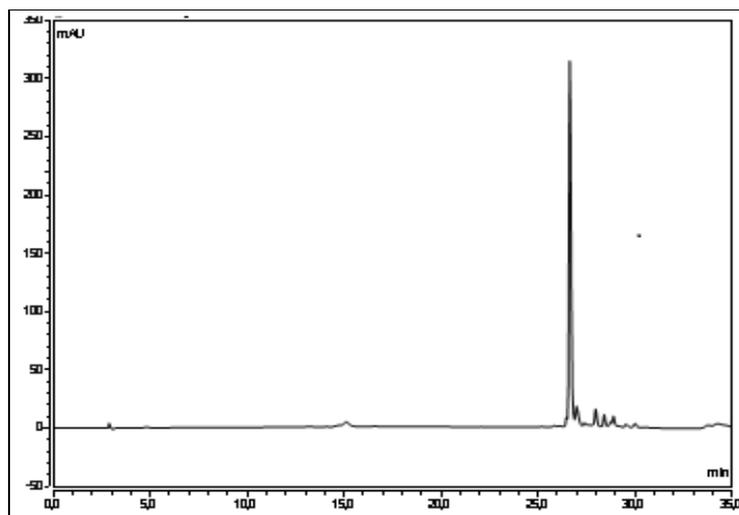


Figura 15. Cromatograma da solução padrão de rutina ricinoleato

4.3.2 Validação do método de CLAE-DAD

Após a otimização das condições do CLAE, o método foi validado em termos de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e precisão.

4.3.2.1 Linearidade

A linearidade refere-se à habilidade que um método analítico tem de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância estudada. A linearidade do método para a determinação da rutina ricinoleato foi avaliada por meio da curva analítica, envolvendo diluições seriadas da rutina padrão de referência e da amostra padrão do éster de rutina.

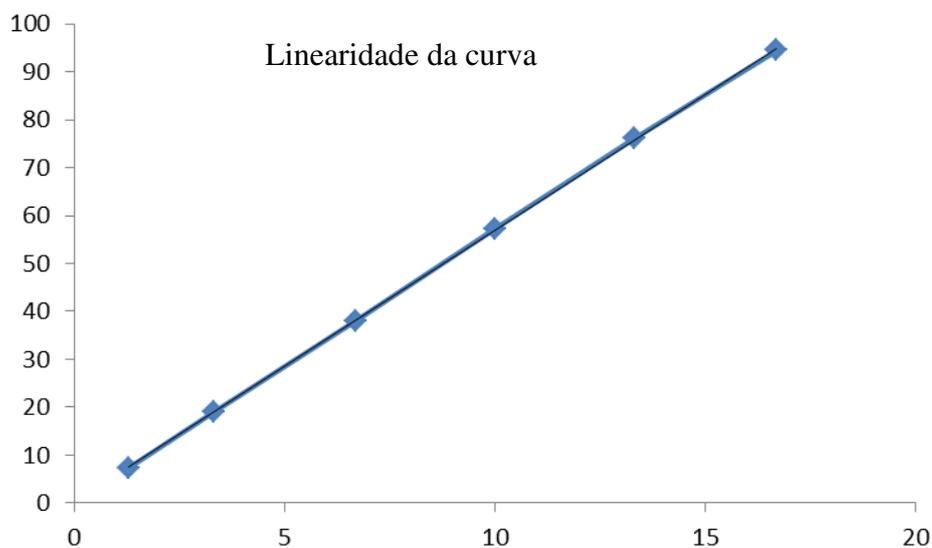
Para a construção da curva de calibração do éster utilizou-se uma solução padrão de 13,32 $\mu\text{g/mL}$ de rutina ricinoleato em metanol grau HPLC. A partir dessa solução padrão, foram injetados volumes variados para a obtenção de seis níveis diferentes de concentração variando de 1,3 a 16,7 mg/mL . Foram realizadas três injeções para cada concentração ($n=18$). O mesmo procedimento foi aplicado para a construção da curva de calibração da rutina, utilizando-se uma solução padrão de 1,5 mg/mL e injetando-se diferentes volumes no sentido de obter níveis de concentração variando de 0,15-3,0 mg/mL (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos valores experimentais para a construção da curva de calibração

Concentração de Rutina ricinoleato (mg/mL)	Concentração de Rutina (mg/mL)	Média das áreas de integração dos picos (mAU)	
		Rutina ricinoleato	Rutina
1,3	0,15	7,42	40,04
3,3	0,38	18,99	98,10
6,7	0,75	38,07	190,12
10,0	1,5	57,23	372,52
13,3	2,3	76,03	577,10
16,7	3,0	94,50	769,32

Fonte: Pesquisa experimental, 2015.

Cada curva foi ajustada pela regressão linear através da média das três leituras de cada concentração. A linearidade do método proposto foi avaliada através do coeficiente de correlação e interceptação de valores. Utilizando-se os dados de concentração x área do pico, construiu-se a curva de calibração para cada padrão, com as respostas relativas no eixo Y e as concentrações correspondentes no eixo X (Figuras 16 e 17).

**Figura 16.** Curva de Calibração da Rutina ricinoleato

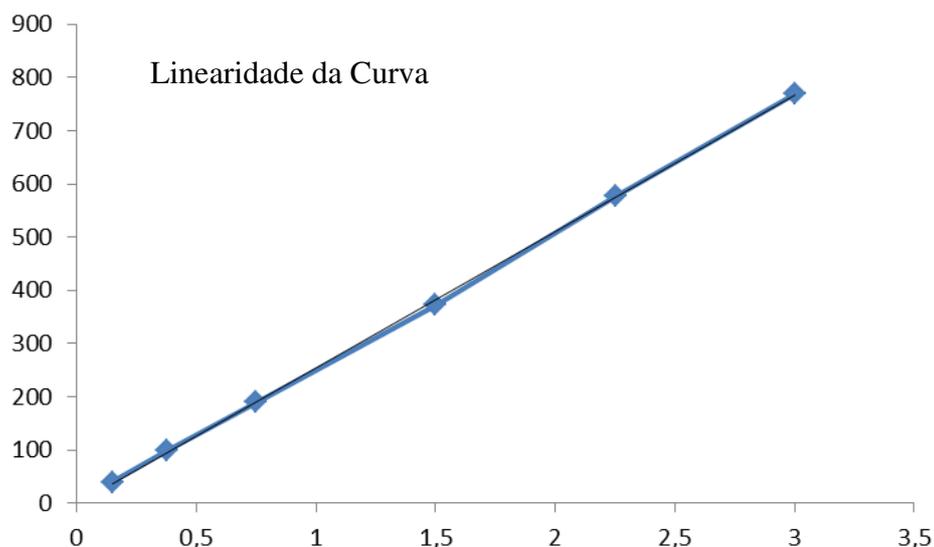


Figura 17. Curva de calibração da Rutina

A partir da construção da curva de calibração foi obtida a equação da reta e seu coeficiente de correlação linear, conforme tabela 5.

Tabela 5. Equação da reta e coeficiente de correlação linear

Composto	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear
Rutina ricinoleato	$Y = 5,6711x + 0,2184$	0,9999
Rutina	$Y = 225,76x - 0,8751$	0,9997

Fonte: Pesquisa experimental, 2015

Analisando-se os resultados obtidos, constatou-se que o método analítico utilizado foi considerado linear, apresentando coeficiente de correlação (r^2) próximo de um, estando dentro dos padrões estabelecidos para linearidade (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

4.3.2.2 Limite de detecção e quantificação

A sensibilidade refere-se à capacidade de um método de distinguir pequenas variações de concentração de determinado analito (RIBANI *et al*, 2004). A sensibilidade é determinada através dos Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD), os quais foram estimados pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração.

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada em uma amostra. Seu valor pode ser estabelecido pelo cálculo de três

vezes o sinal do ruído. O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade da substância que pode ser medida em uma amostra. Seu valor pode ser estabelecido pelo cálculo de dez vezes o valor do ruído. Os resultados foram calculados através das seguintes equações:

$$LD = DP_a \times 3/IC$$

$$LQ = DP_a \times 10/IC$$

Onde DP= desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC= inclinação da curva de calibração. Os valores do LD e LQ obtidos para o éster e a rutina encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Composto	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)
Rutina ricinoleato	0,115	0,385
Rutina	0,0116	0,0387

Fonte: Pesquisa experimental, 2015

Estes valores demonstram que o método analítico empregado apresenta-se adequado para a detecção e quantificação da rutina e do seu respectivo éster.

4.3.2.3 Precisão do método

A precisão do método foi avaliada em relação aos níveis de repetibilidade dos resultados obtidos, registrando-se os valores das áreas dos picos cromatográficos e calculando-se o desvio padrão das determinações. Dados de precisão referem-se o quanto próximo os resultados estão uns dos outros. Para isto, foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) de três soluções padrões de concentrações baixa, média e alta para o éster e para a rutina, injetadas em triplicatas, sob as mesmas condições, em um total de nove determinações. Os resultados das análises foram expressos em termos de coeficiente de variação (CV). Quanto menor o coeficiente de variação mais homogêneo serão os dados. Os valores dos coeficientes foram calculados conforme a seguinte fórmula:

$$CV\% \text{ ou DPR} = DP/CMD \times 100$$

onde DP corresponde ao desvio padrão e CMD corresponde à concentração média determinada (Tabela 7).

Tabela 7. Estudos de precisão para a Rutina ricinoleato e Rutina

Composto	Conc. (mg/ml)	DP	%DPR
Rutina ricinoleato	3,3	0,090184995	0,47217275
	10,0	0,205507501	0,35746652
	16,7	1,478862175	1,56526479
Rutina	0,38	0,299555226	0,31949150
	1,5	0,212210587	0,05787351
	3,0	3,238785781	0,44516333

Fonte: Pesquisa experimental, 2015

O método também se apresenta preciso, já que os valores de DPR foram inferiores a 1,64%. São aceitáveis valores inferiores a 5% (ICH, 2005).

4.3.2.4 Exatidão do método

A exatidão refere-se à proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método foi avaliada utilizando-se três diferentes concentrações para a rutina ricinoleato e para a rutina, em triplicata para cada nível. Os resultados foram calculados de acordo com a equação:

$$\text{Exatidão} = \text{Concentração média experimental} / \text{Concentração teórica} \times 100$$

A exatidão encontrada neste experimento está descrita na Tabela 8. Observa-se que o método apresentou exatidão na faixa de 106 a 110% para o padrão de rutina e 99 a 101% para o éster. Neste sentido, o método analítico apresentou-se confiável para a quantificação da rutina ricinoleato.

Tabela 8. Dados de exatidão

Compostos	Concentração real (mg/mL)	Concentração média experimental (mg/mL)	Exatidão (%)	DPR (%)
Rutina ricinoleato	3,3	3,33	100,91%	0,47217275
	10,0	10,09	100,90%	0,35746652
	16,7	16,62	99,52%	1,56526479
Rutina	0,38	0,42	110,52%	0,31949150
	1,5	1,63	108,66%	0,05787351
	3,0	3,2	106,66%	0,44516333

Fonte: Pesquisa experimental, 2015

4.3.3 Análise quantitativa da rutina ricinoleato

Em experimentos realizados anteriormente, a reação de síntese de rutina ricinoleato foi monitorada em seis diferentes intervalos: 0, 1, 2, 4, 8 e 16 horas de reação. Durante este período não foi observada a formação do éster (Figura 18). Posteriormente, a reação foi monitorada em intervalos maiores, retirando-se alíquotas a cada 24 horas de reação, em um total de 6 determinações: 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de reação (Figura 19). Em todos os experimentos analisados, verificamos que a formação do éster só começa após 24 horas de reação e os melhores resultados foram alcançados em 120 horas de reação. Observamos também que prolongar a reação após este período, não aumentava significativamente o rendimento alcançado na formação do éster, corroborando com os dados obtidos no estudo de acilação enzimática da naringina (ALMEIDA, 2012).

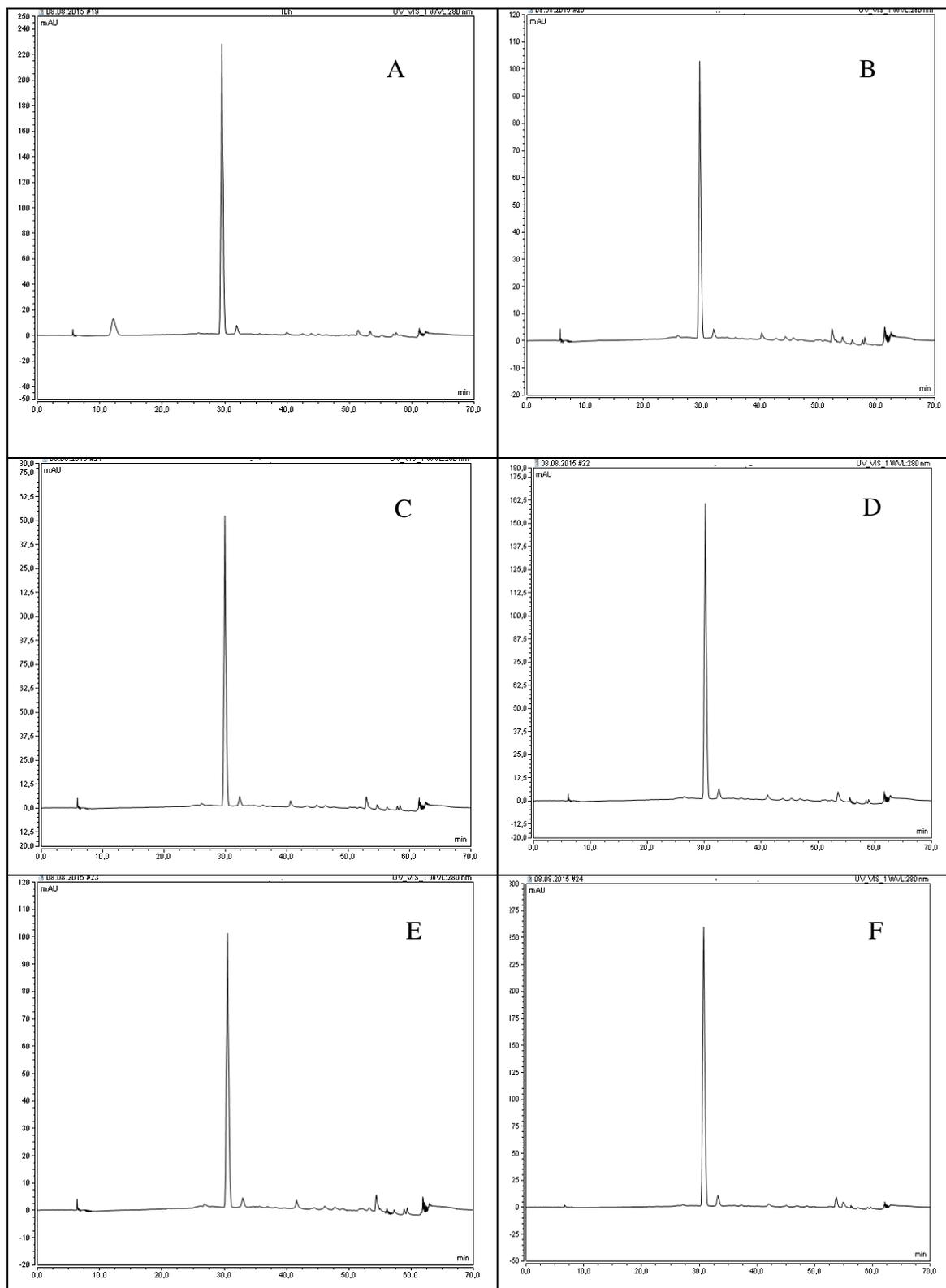


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de síntese da rutina ricinoleato. A: Tempo zero; B: 1h de reação; C: 2h de reação; D: 4 h de reação; E: 8h de reação e F: 16h de reação.

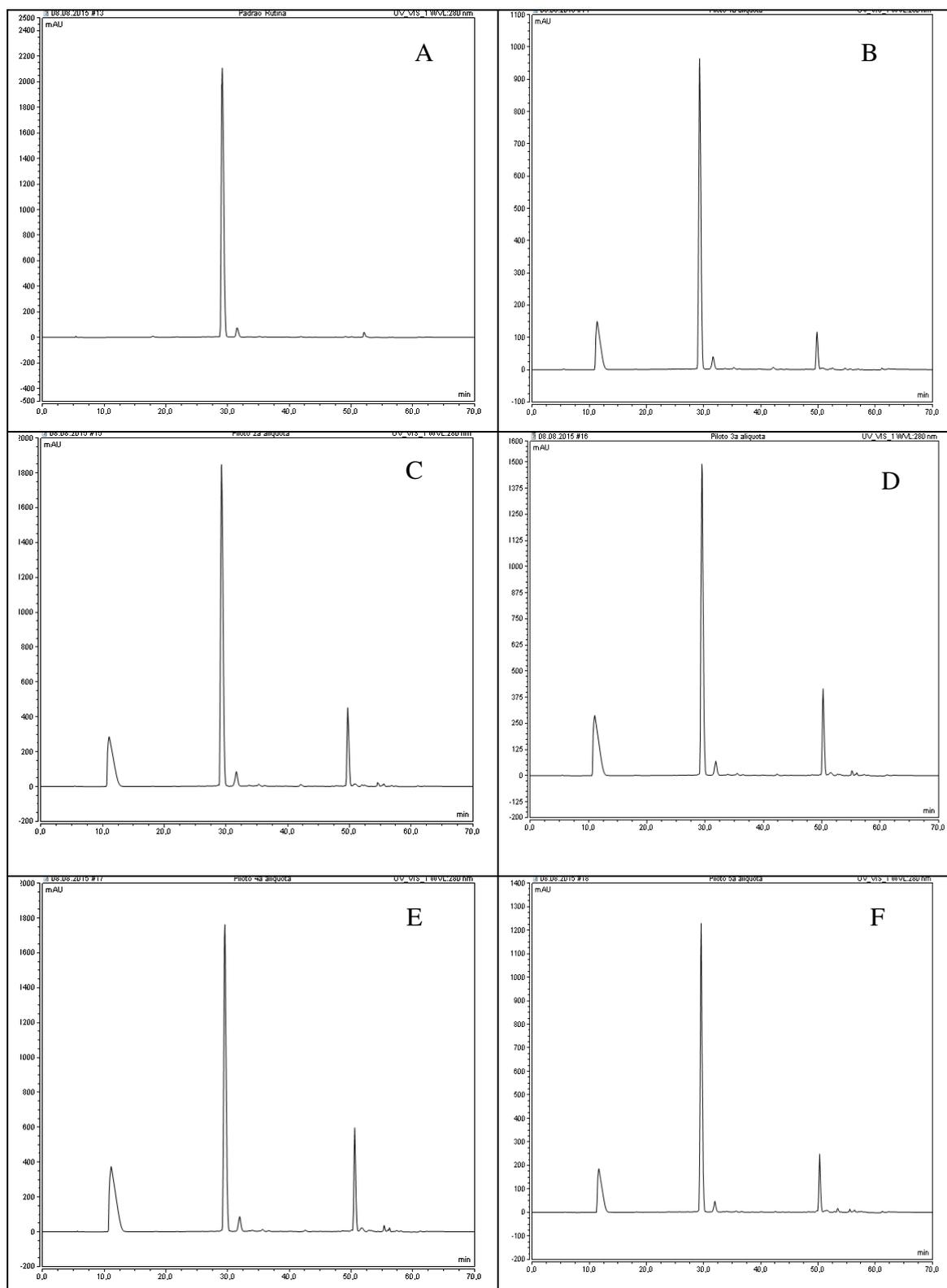


Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da reação de síntese da rutina ricinoleato. A: Padrão de Rutina; B: 24h de reação; C: 48h de reação; D: 72 h de reação; E: 96h de reação e F: 120h de reação.

Com base nestes dados, o experimento realizado para a quantificação do éster derivado da rutina foi conduzido até 120 horas de reação. As reações foram realizadas sob condições que permitiram avaliar a eficiência da bioconversão nos tempos 0, 24 e 120 horas, mantendo-se fixas as demais condições de temperatura, concentração de enzima, proporção de solvente e substratos utilizados. O experimento foi realizado em duplicata. Os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

De acordo com os dados apresentados, observa-se que a formação de éster inicia-se após 24 horas de reação, variando de forma significativa ao longo do tempo. Podemos observar que à medida que a concentração do éster aumenta, decresce a concentração de rutina na amostra. Nas primeiras 24 horas de reação houve um decréscimo de aproximadamente 87% na concentração de rutina e após 120 horas, cerca de 93% da rutina foi consumida (Figura 20).

Tabela 9. Concentração em mg/mL de rutina e de éster formado na reação de acilação ao longo de 120 horas

Tempo (horas)	Concentração Nominal média da rutina (mg/mL)	Concentração Nominal média do éster (mg/mL)
0	2,72	-
24	0,34	3,74
120	0,19	3,87

Fonte: Pesquisa experimental, 2015

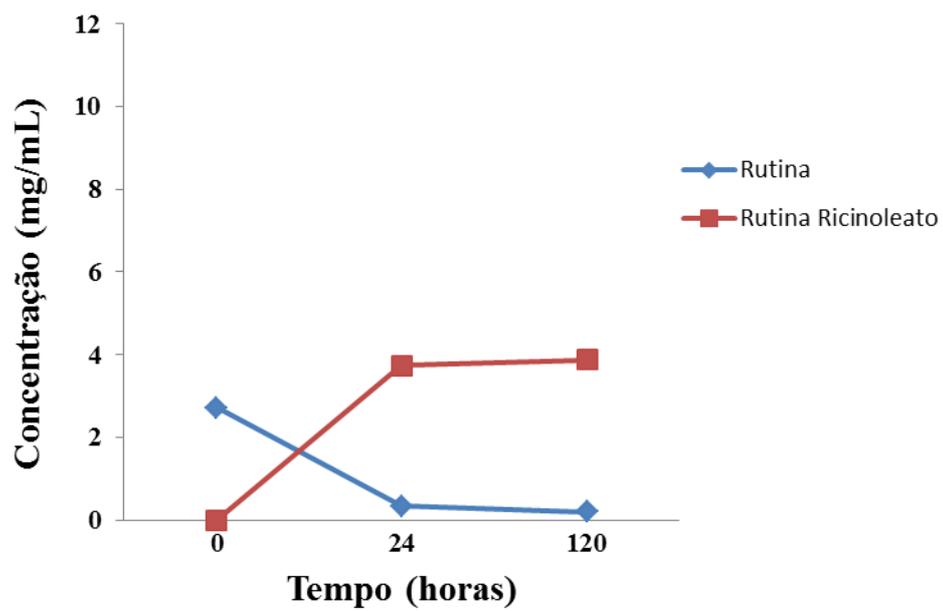


Figura 20. Concentração em mg/mL de éster formado na reação de acilação enzimática da rutina ao longo de 120 horas.

4.4 Análise de toxicidade da rutina ricinoleato

Uma etapa muito importante no estudo de um composto obtido a partir de um produto natural é a determinação do efeito tóxico do mesmo sobre organismos vivos. Como o efeito tóxico ocorre a nível celular, cultivos de células são utilizados para avaliar *in vitro* a toxicidade das substâncias químicas que se verifica *in vivo* (FONTES, 2001). A escolha de células da linhagem Vero para avaliação da atividade citotóxica da rutina ricinoleato foi realizada em função de ser amplamente utilizada como modelo de triagem para testes de citotoxicidade de extratos vegetais e de outros compostos naturais, além de serem facilmente disponíveis e de fácil cultivo (CHIN *et al.*, 2010; BAHAR *et al.*, 2011; NCHU *et al.*, 2011).

Os resultados referentes à avaliação de viabilidade celular revelaram que o éster não demonstrou efeito citotóxico, apresentando percentuais de células viáveis superiores a 90% em todas as concentrações testadas (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL), não diferindo estatisticamente do grupo controle (Figura 21).

Diversos trabalhos descrevem a toxicidade de extratos ou compostos naturais sobre células Vero. Estudos apontam que catequinas isoladas de chá verde podem proteger células Vero contra danos induzidos por uma enterotoxina produzida por *Entamoeba coli* (LIU *et al.*, 2013). Neste estudo, as amostras avaliadas não demonstraram efeito tóxico. Chen *et al.* (2001), isolaram flavonoides de diferentes ervas tradicionais da medicina chinesa e avaliaram a ação citotóxica dos mesmos sobre células Vero. Entre os 40 flavonoides isolados no estudo, somente o flavonoide identificado como astilbin (pertencente ao grupo flavonol) mostrou inibição significativa sobre o crescimento de células Vero (CHEN *et al.*, 2001).

Botura (2011) em um estudo realizado com resíduos de *Agave sisalana* Perr. (SISAL) verificou baixa toxicidade da fração flavonoídica sobre células Vero, uma vez que o percentual de viabilidade celular na maior concentração testada correspondeu a 72% (BOTURA, 2011). Mavundza *et al.* (2010) avaliaram o efeito citotóxico de flavonoides isolados de *Athrixia phylicoides*. Em baixas concentrações, o extrato mostrou nenhuma ou baixa toxicidade em células Vero. No entanto, em concentrações elevadas (400µg/mL) o percentual de viabilidade celular foi menor que 40%. O extrato aquoso da mesma espécie não demonstrou toxicidade em células Vero.

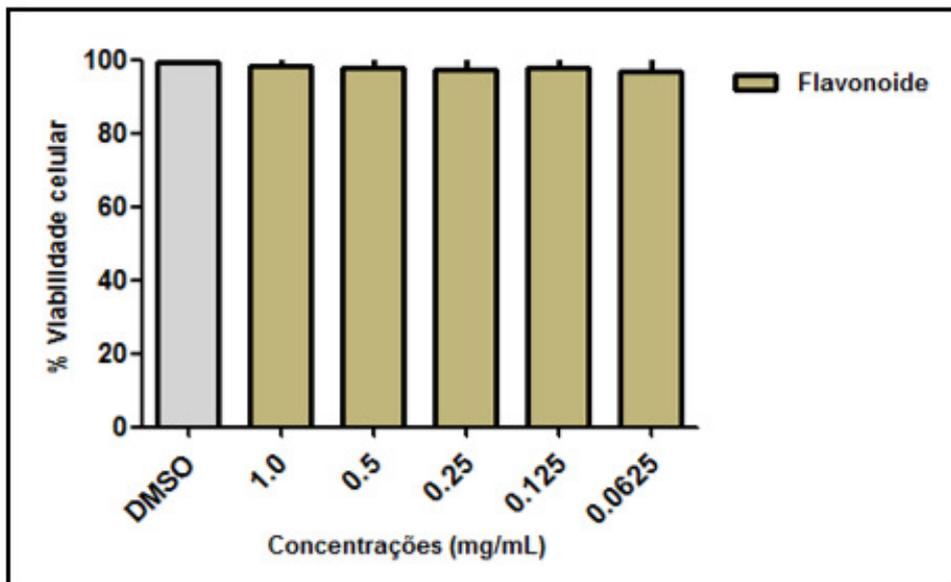


Figura 21. Percentual de viabilidade de células Vero após o tratamento com a rutina ricinoleato no teste de MTT.

A avaliação morfológica, não evidenciou a presença de diferenças morfológicas, confirmando os percentuais de células viáveis superiores a 90% nas concentrações testadas, como mostra a Figura 22.

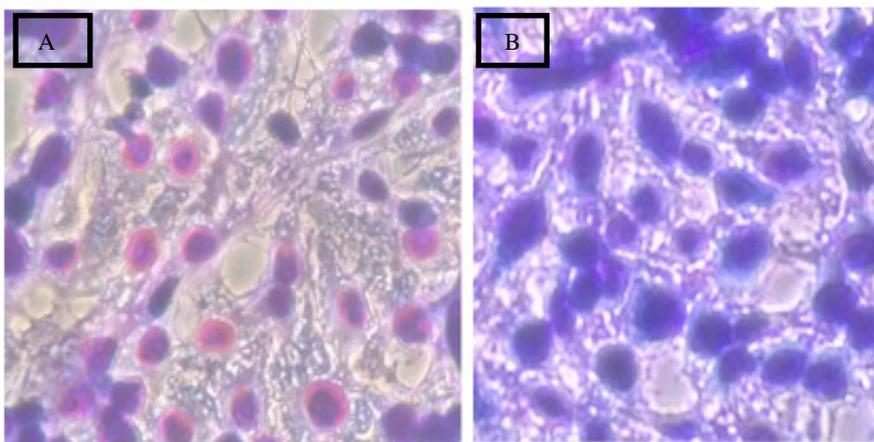


Figura 22- Cultivo de células Vero após 24h de exposição ao éster da rutina:
A: controle negativo e B: rutina ricinoleato 1 mg/mL

4.5 Análise da atividade antioxidante

A rutina ricinoleato foi avaliada quanto à sua capacidade antioxidante, através dos métodos do sequestro do radical livre DPPH• e da inibição da auto-oxidação do beta-caroteno.

No método do DPPH•, os resultados foram expressos em percentuais de sequestro de radicais livres (% SRL). O método consiste em avaliar a capacidade antioxidante através da atividade sequestradora do radical livre DPPH•, que possui coloração púrpura, absorvendo um comprimento de onda máximo de até 518 nm. A técnica baseia-se na transferência de elétrons, algumas substâncias são capazes de doar um átomo de hidrogênio para o radical, reduzindo-o a difenil-picrilhidrazina, de coloração amarela, com conseqüente redução de absorbância (ALVES *et al.*, 2010).

A porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH• consumida pelo éster. Neste estudo, quando se comparam os valores percentuais de sequestro de radicais livres (% SRL) do éster e do padrão, observa-se boa atividade antioxidante, com percentagem de sequestro de radicais de DPPH• acima de 50% para as amostras testadas numa concentração de 50 µg/ml. Os valores de % SRL encontrados foram iguais a 63,08 e 57,48 (para o éster obtido após 72 e 120 horas de reação, respectivamente) e a 61,21 para o padrão de rutina.

No método da inibição da auto-oxidação do beta-caroteno, os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante. O teste é baseado na capacidade de determinadas substâncias protegerem o beta caroteno da oxidação. Esta oxidação é provocada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico. O ácido linoleico em presença de oxigênio forma o radical peroxil (LOO•), que reage com o beta-caroteno, atacando seu cromóforo, resultando no clareamento da solução, que passa de amarelo intenso para amarelo claro (DAMASCENO, 2011). A atividade antioxidante por este método é muito útil, especialmente na avaliação de antioxidantes lipofílicos (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

A ação antioxidante das amostras avaliadas pelo sistema ácido linoleico/beta caroteno, variou de $58,82 \pm 3,42\%$ a $55,64 \pm 2,75\%$ (para o éster obtido após 72 e 120 horas de reação, respectivamente). Neste teste, os resultados foram comparados com a rutina ($63,45 \pm 4,99\%$) e a quercetina, sendo que a quercetina apresentou o melhor efeito, com $70,22 \pm 5,23\%$ de atividade antioxidante.

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de atividade antioxidante, não houve diferença significativa entre as médias das amostras e da rutina segundo o teste de Tukey com $p < 0,05$.

Sabe-se que a capacidade antioxidante dos flavonoides está relacionada a características estruturais da molécula, como o número e posição das hidroxilas esterificadas e livres, à presença de glicosídeos ligados ao anel, dentre outras características. A configuração das hidroxilas ligadas ao anel B (C4 e C3) do flavonoide interfere de maneira significativa no sequestro de radicais livres, aumentando o potencial antioxidante da molécula. Por outro lado, as substituições nos anéis A e C exercem menor impacto neste sentido (BURDA, S.; OLESZEK, W. 2001).

Santos *et al.* (1999), estudaram o potencial antioxidante dos flavonoides rutina, narigenina e ácido nicotínico, isolados e associados, em relação ao metabolismo de lipídeos, comprovando que a narigenina e ácido nicotínico apresentaram maior percentual de redução do colesterol, enquanto que a narigenina e rutina foram mais eficazes na redução do colesterol puro e dos triacilgliceróis respectivamente. Silva *et al.* (2001), avaliou o efeito da rutina sobre o metabolismo lipídico, onde o flavonoide reduziu em 28,82% os níveis de colesterol total, 28,32% o colesterol-LDL e em 89,84% os níveis de triglicérides. Os mecanismos da ação hipolipemiante envolvem aumento da excreção de sais biliares nas fezes e a elevação da atividade de enzimas do sistema microsomal hepático, responsável pelo aumento do metabolismo lipídico.

Diversos estudos sugerem que a acilação enzimática de flavonoides melhora a capacidade antioxidante dos mesmos (KATZOURA *et al.*, 2006; MELLOU *et al.*, 2005). Viskupicova *et al.* (2010) estudaram a atividade antioxidante de derivados lipofílicos da rutina obtidos por acilação enzimática com ácidos graxos saturados e insaturados (C4-C18). A capacidade antioxidante dos ésteres lipofílicos da rutina variou de 60,7% a 78,9% para o teste do DPPH• e de 75,7 % a 96,6% para o teste do beta caroteno. Alguns ésteres obtidos no estudo demonstraram atividade antioxidante superior à observada com a rutina.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o composto obtido após reação de esterificação (rutina ricinoleato) apresentou atividade antioxidante, nas condições testadas, verificada pelo teste do DPPH• e do beta-caroteno, quando comparado ao padrão de rutina, flavonoide com atividade antioxidante reconhecida pela literatura.

5. CONCLUSÃO

O crescente interesse por compostos naturais farmacologicamente ativos têm estimulado cada vez mais pesquisas acerca da transformação enzimática de flavonoides. O potencial de aplicação de lipases em reações de biocatálise envolvendo flavonoides tem sido objetivo de diversas pesquisas nos últimos anos. A otimização da técnica através da imobilização de enzimas, adição de peneiras moleculares e outros efeitos aditivos contribuem para o sucesso da reação, constituindo em um efetivo e prático método de síntese.

Flavonoides glicosilados são compostos biologicamente ativos e por isso, comumente incorporados como ingredientes ativos em diversas formulações cosméticas, farmacêuticas e também em indústrias de alimentos. No entanto, a natureza hidrofílica destas moléculas reduz a efetividade e a estabilidade das mesmas em matrizes lipofílicas, constituindo uma séria desvantagem quando uma fase aquosa está também presente no meio.

Este trabalho contribuiu para o conhecimento científico da rutina e do composto obtido, a rutina-*O*-ricinoleato, a partir da acilação enzimática do flavonoide com óleo de mamona.

A estrutura do composto foi determinada através de técnicas espectroscópicas, cromatografia líquida/espectroscopia de massas (CLAE/EM) e pela Ressonância magnética nuclear. Somente um produto majoritário foi identificado por RMN e CLAE/EM, o que indica que a esterificação foi regioseletiva. Os resultados demonstraram que apenas um éster monoacilado foi sintetizado e a comparação dos espectros aponta que a acilação ocorreu na posição 4''-OH da molécula da ramnose.

A validade do método quantitativo empregado para a determinação simultânea da rutina e do éster foi verificada, apresentando precisão e exatidão adequadas, como mostrado nas curvas de calibração. O método também apresentou sensibilidade satisfatória para o ensaio de quantificação. Assim, ensaios que empreguem pequenas concentrações de amostras de rutina e seu éster podem ser quantificados com precisão e exatidão aceitáveis dentro do limite de quantificação.

Na análise de toxicidade, os resultados revelaram baixa ou nenhuma evidência de citotoxicidade demonstrando maior potencial de utilização deste composto em investigações subsequentes sobre a aplicação do éster em formulações lipofílicas.

A esterificação seletiva da rutina não alterou de maneira significativa a capacidade antioxidante do flavonoide inicial. Considerando que compostos antioxidantes naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra diversas doenças, os resultados obtidos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante da rutina ricinoleato considerando que o composto apresentou boa atividade antioxidante e toxicidade reduzida.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M. **Perfilamento de metabólitos secundários, prospecção química e estudos taxonômicos de fungos endófitos**. 2010. 1v. 301f. Dissertação (Doutorado em Química)- UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- ADAMCZAK, M. AND KRISHNA,S.H. Strategies for improving enzymes for efficient biocatalyses. **Food Technology and Biotechnology**, v.42, n.4, p.251-264, 2004.
- ALMEIDA *et al.* Synthesis of naringin 6''-ricinoleate using immobilised lipase. **Chemistry Central Journal**, v.6, p.41, 2012.
- ALMEIDA, VERÔNICA MARQUESINE. **Acilação enzimática de naringina com o ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico, catalisada por lipase B de *Candida antarctica***. 2011. 1v. 93f. Dissertação de Mestrado-UEFS, Feira de Santana, Bahia.
- ALVES *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- ANDO, A. *et al.* Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarium* JCM 1551. **Enzyme Microbial technol.**, v.35, p.40-45, 2004.
- ARAÚJO, C.S. **Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae)**. Dissertação de mestrado, 198f, UNIVASF, Petrolina, 2013.
- ARCT, J.; PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v.26, p.347-357, 2008.
- BAHAR, M. *et al.* Potent antiprotozoal activity of a novel semi-synthetic berberine derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21,n.9, p.2606-2610, 2011.
- BANFI, D.; PATINY, L. www.Nmrdb.org: Resurrecting and processing NMR spectra on line, **Chimia**, v.62, n.4, p.280-281, 2008.
- BELTRÃO, N. E. de M.; **O biodiesel do óleo da mamona e a produção de fitomassa: considerações gerais e singularidade**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2004, 2p.
- BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, n.18, p.2505-2512, 2011.
- BISCOFF, S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.11, n.6, p. 733-734, 2008.
- BOTURA, M.B. **Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana* Perr. (Sisal) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos**. Tese de doutorado, 101f, UEFS, Feira de Santana, 2011.

- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2774-2779, 2001.
- BRASIL, Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
- CARDOZO, K.H.M. *et al.* Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilina coast. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.2, p.202-208, 2011.
- CARREA, G.; RIVA, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v.39, n.13, p.2226-22-54, 2000.
- CESTI, P.; ZAKS, A.; KLIBANOV, M. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.11, p.401-407, 1985.
- CHEBIL, I. *et al.* Enzymatic acylation of flavonoids. **Process Biochemistry**, v. 41, p.2237-2251, 2006.
- CHIERIC, G.O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D.M. P de LIMA, E.F. (Org). O Agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologias, (org.), p. 89-120, 2001.
- CHEN, T.H. *et al.* The in vitro effect of flavonoid astibilin on 3-hydroxy-3-methylglutaril-CoA reductase on Vero cells, v.64, n.7, p.382-387, 2001.
- CHIN, L.W. *et al.* Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. **Archives of Virology**, v.155, p.1933-1941, 2010.
- CHUA, L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, p. 805-817, 2013.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia, **Editora da Unicamp**, Campinas, 2006.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, (2015) *Mamona*. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 28 mai. 2016.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v.39, p.1-15, 2004.
- DAMASCENO *et al.* Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.1, p.78-85, 2011.
- D’ARCHIVIO, M. *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v.43, n.4, p.348-361, 2007.

DHAKE, K.P. et al. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance *ester* compounds. **Flavour and fragrance Journal**, v.28, p. 71-83, 2013.

DUAN, Y. Effect of molecular sieves on lipase-catalysed esterification of rutin with steric acid. **J. Agric. Food Chem.** V.54, p.6219-6225, 2006.

DUARTE-ALMEIDA *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, Campinas, 2006.

DUNN, P.J. The importance of green chemistry in process research and development. **Chemical Society Reviews**, v.41, n.4, p1452-1461, 2012.

ENAUD, E. *et al.* Enzymatic synthesis of new aromatic of phloridzin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.27, n.1, p.1-6, 2004.

FREIRE, M.M. *et al.* Avaliação da qualidade do óleo de mamona de diferentes genótipos. In: Congresso Brasileiro de Mamona. 2006, Campina Grande. Anais...Campina Grande, 2006. 1 CD- ROM.

GAO, W.L.; LIU, H.; ZONG, M.H. Regioselective enzymatic undecylenoylation of 8-chloroadenosine and its analogs with biomass-based 2-methyltetrahydrofuran as solvent. **Bioresource Technology**, v.118, p.82-88, 2012.

GAYOT, S.; SANTARELLI, X.; COULON D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. **Journal of Biotechnology**, v.101, p.29-36, 2003.

GODOY, R.L.O. *et al.* Separação e identificação de flavonoides por UPLC-ESI-QTOF-MSMS. In: Congresso Latino Americano de Cromatografia e técnicas relacionadas, 14, Florianópolis. Livro de resumos, p.60, 2012.

GONZÁLEZ-SABIN, J.; MORÁN-RAMALLAL, R.; REBOLLEDO, F. Regioselective enzyme acylation of complex natural products: expanding molecular diversity. **Chemical Society Reviews**, v.40, n.12, p.5321-5335, 2011.

GUARDIA, T. *et al.* Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. II **Pharmacology**, v.56, p.683-687, 2001.

HADDAD, A.Q. *et al.* Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. **Prostate Cancer and Prostatic diseases**, v.9, p.68-76, 2006.

HARBORNE, J.B. The flavonoids. In: __, eds. The flavonoids: advances in research since 1980. New York, Chapman and Hall, 1988.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILIA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HIDALGO, ME. *et al.* Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v.37, p.1585-1587, 1994.

ICH, Q2, Text on validation of Analytical procedures: Methodology, International conference on Harmonization, 2005.

INMETRO-Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2010.

JANBAZ, K.H. *et al.* Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄- induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v.73, p.557-563, 2002.

JEONG, J. *et al.* Rutin from *Lonicera japonica* inhibits myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in vivo and protects H9c2 cells against hydrogen peroxide-mediated injury via ERK1/2 and PI3K/Akt signals in vitro. **Food Chemistry and Toxicology**, v.47, p. 1569-1576, 2009.

JOSE, C.J.M.D.S.M. *et al.* Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.773-777, 2011.

KANTOGIANNI, A. *et al.* Lipase-catalysed esterification of rutin and narigin with fatty acids of medium carbon chain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p.59-62, 2003.

KATSOURA, M.H. *et al.* Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. **Journal of Biotechnology**, v.123, p.491-503, 2006.

KATSOURA, M.H. *et al.* Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. **Process Biochemistry**, v.42, p.1326-1334, 2007.

KAUL, P.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U. C. Opportunities for the pharmaceutical industry: key biotransformation technologies of the future. **Drug Discovery World**. **Spring Ed.**, p. 80-86, 2004.

KHAN, N.R.; RATHOD, V.K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetics esters and intensification: a review. **Process Biochemistry**, 2015

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, p.241-246, 2001.

KOELLER, K.M; WONG, C.H. Enzymes for chemical synthesis . **Nature.**, v. 409, p.232-240. 2001.

- KYOBE, J.W. *et al.* Cadmium sulfide quantum dots stabilized by castor oil and ricinoleic acid. **Physica E**, v.76, p.95-102, 2016.
- LE, K., CHIU, F. & NG, K. Identification and quantification of antioxidants in fructus lycii. **Food Chemistry**, v.105, p.353-363, 2007.
- LI *et al.* Synthesis of a library of glycosylated flavonols. **Tetrahedron Letters**, v.49, p.7243-7245, 2008.
- LI, K-K. *et al.* The metabolites of mangrove endophytic fungus Zh6-B1 from the South China Sea. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3326-3328, 2010.
- LIU, X.L *et al.* Anti- *Escherchia coli* 0157:H7 Properties of purple prouries clover and sainfoin condensed tannins, **Molecules**, v.18, n.2, p.2183-2199, 2013.
- LÓPEZ-REVUELTA, A. *et al.* Membrane cholesterol content influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damage by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v.161, n.1, p.79-91, 2006.
- MACHADO, H. **Atividade dos flavonoides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.
- MANACH, C. *et al.* - Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.81, n.1, p230S-242S, 2005.
- MAVUNDZA, E.J. *et al.* Antioxidant activity and cytotoxicity effect of flavonoids isolated from *Arthrixia phylicoides*. **Journal of Medicinal Plants**, v.4, n.23, p.2583-2586, 2010.
- MELLOU, F. *et al.* Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. **Journal of Biotechnology**, v.116, p. 205-304, 2005.
- MELLOU, F. *et al.* Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. **Process Biochemistry**, v.41, p.2029-2034, 2006.
- MILDE, J; ELSTNER, E.F.; GRAXMANN,J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, terpinenene, and ascorbic acid. **Phytomedicine**, v.11, p.105-113, 2004.
- MIYAZAWA, T. *et al.* *Candida antarctica* lipase-B mediated regioselective acylation of dihydroxybenzenes in organic solvents. **Tetrahedron**, v.71, p.3915-3923, 2015.
- MOHD ZAINOL, M.K *et al.* Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. **International Food Research Journal**, v.16, p.531-537, 2009.

NAKAJIMA N. *et al.* Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87,p.105-107,1999.

NCHU, A.F. *et al.* Anthelmintic and cytotoxic activities of extractus of Markhamia obtusifolia Sprague (Bignoniaceae). *Veterinary Parasitology*, v.183, p.184-188, 2011.

OGUNNIYI, D.S. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, n.9, p.1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, C.A *et al.* Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.148, p.154-159, 2015.

OLIVEIRA, E.B. *et al.* A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalysed by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalyses B: enzymatic**, v.59, n1-3, p.96-105, 2009.

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

PEDRIALI, C.A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** Dissertação de mestrado, 127f, USP, São Paulo, 2005.

PEREZ-VIZCAINO, F. *et al.* The flavonoid quercetin induces vasodilator effects in healthy volunteers: Correlation with beta-glucuronidase activity. **Pharmacological Research**, v.89, p.11-8, 2014.

PLAZA, M. *et al.* Substituente effects on in vitro antioxidizing properties, stability and solubility in flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.3321-3333, 2014.

REIS, B. *et al.* Structure-property-activity relationship of phenolics acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl eters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6986-6993, 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, 27(5): 771-780, 2004.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolics acids in *Myrcia bela* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined whit NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SANTOS, V.A.F.F.M. **Avaliação da capacidade antioxidante e possíveis associações sinérgicas de substâncias fenólicas em *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae).** Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2006. 150f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SHAHIDI, F., & ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, p.930-940, 2010.

SILVA, R.R. *et al.* Hypocholesterolemic effect of naringin and rutin flavonoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.51, n.3, p.258-264.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 1102p.

SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 273-286, 2005.

STEINBECK, CHRISTOPH, STEFAN KRAUSE, STEFAN KUHN. NMR shiftTDB construting a free chemical information system with open source. **Journal of Chemical Information and computer Sciences**, v.43, n.6, p.1733-1739, 2003.

STREGE, M.A. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications**, v.725, n.1, p.67-78, 1999.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.69-85, 2006.

VANDRESEN, F. **Constituição química, atividades antibacteriana, antiedematogênica e toxicidade frente à *Artemia salina* da espécie vegetal *Aloysiagrattissima* (Gillies&Hook). Troncoso (Verbenaceae)**. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá, 2005.

VEITCH, N.C.; GRAYER, R.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Products Reports**, v.28, n.10, p.1613-1774, 2011.

VISKUPICOVA, J. Liphophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. **Food Chemistry**, v.123, p.45-50, 2010.

WANG, J. *et al.* Enhancement of the selective enzymatic biotransformation of rutin to isoquercitrin using an ionic liquid as a co-solvent. **Bioresource Technology**, v.128, p. 156-163, 2013.

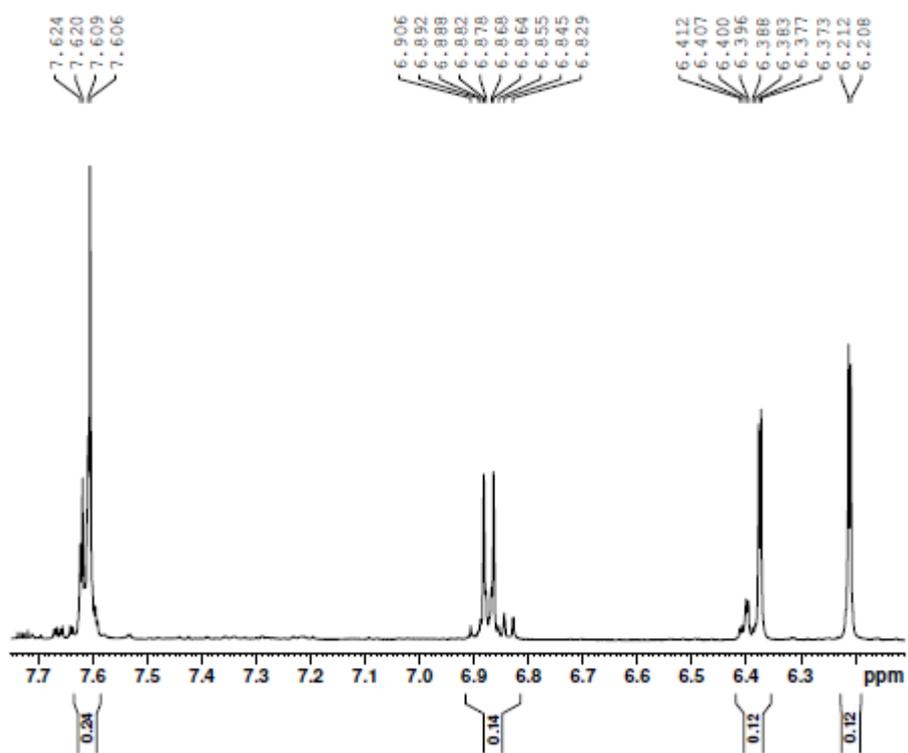
WANG, Q.E.; TANG A.B.; SHI, B. The synthesis of liposoluble tea polyphenols (LTP) and its resistance to autoxidation of oil. **Natural Product Research Development**, v.13, p.12-15, 2001.

XANTHAKIS, E. *et al.* Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids: structural and functional diversity of the novel derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n.1, p.1-16, 2010.

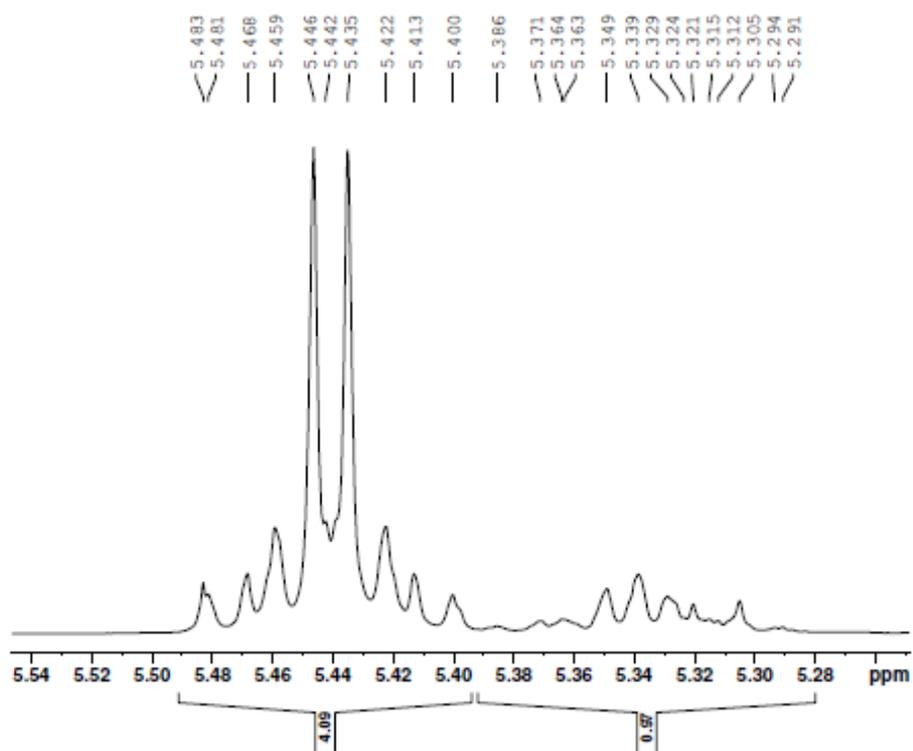
YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT**, v.41, p.1.

ANEXOS

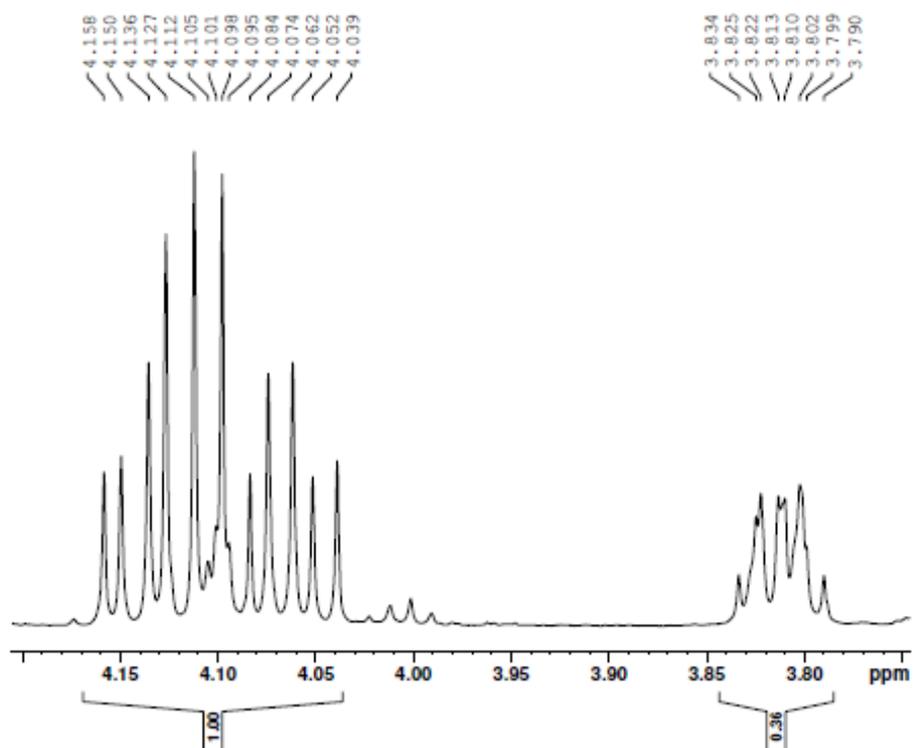
ANEXO I: Ampliação entre as regiões 6,0 e 7,7 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)



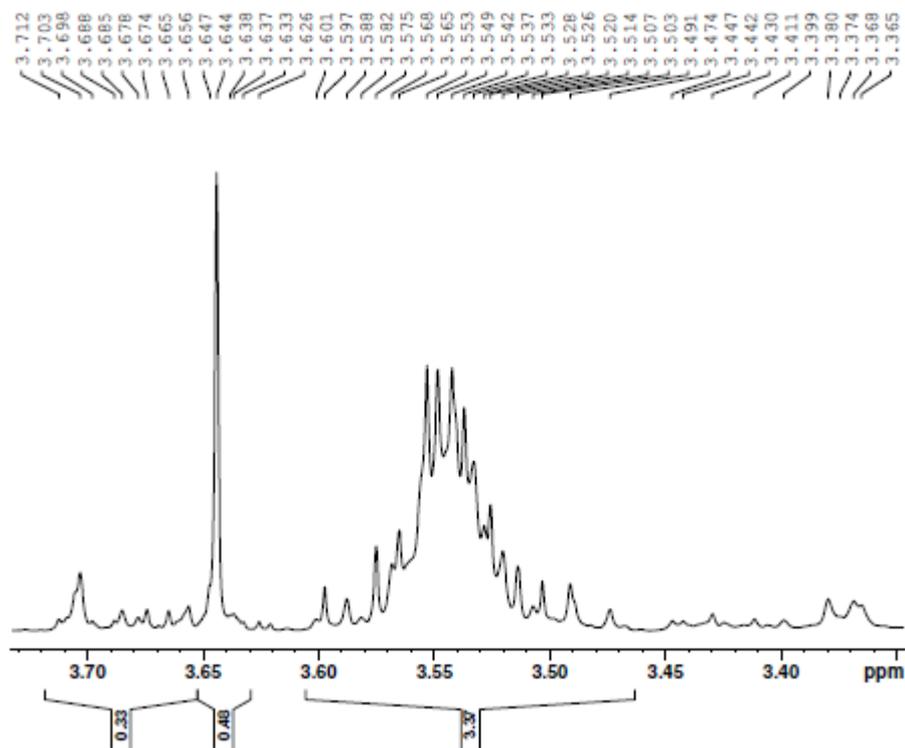
ANEXO II: Ampliação entre as regiões 5,0 e 5,5 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)



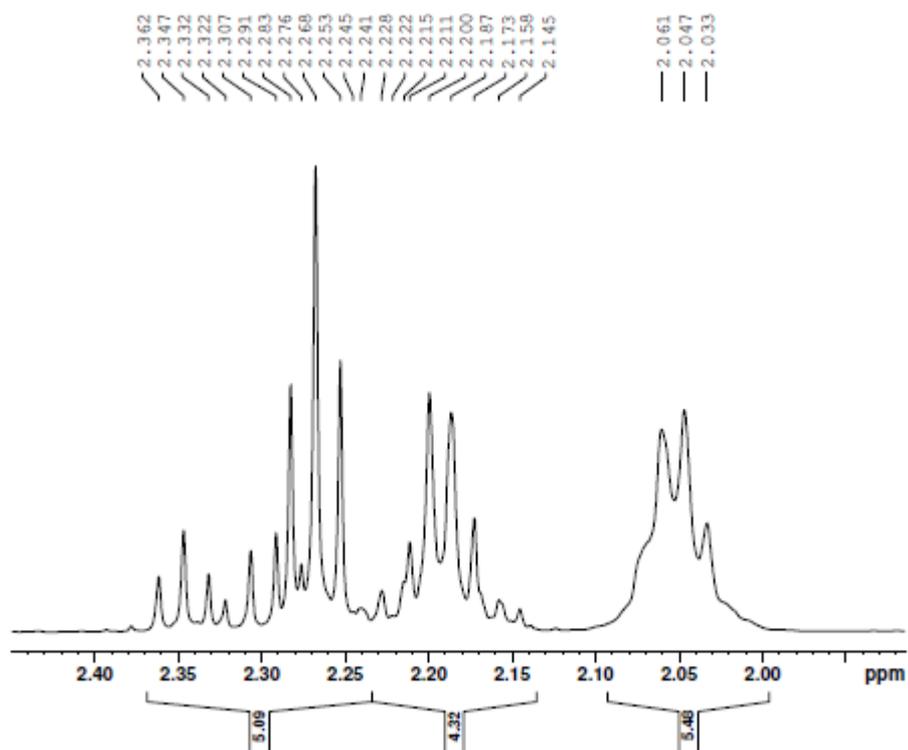
ANEXO III: Ampliação entre as regiões 3,8 e 4,2 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)



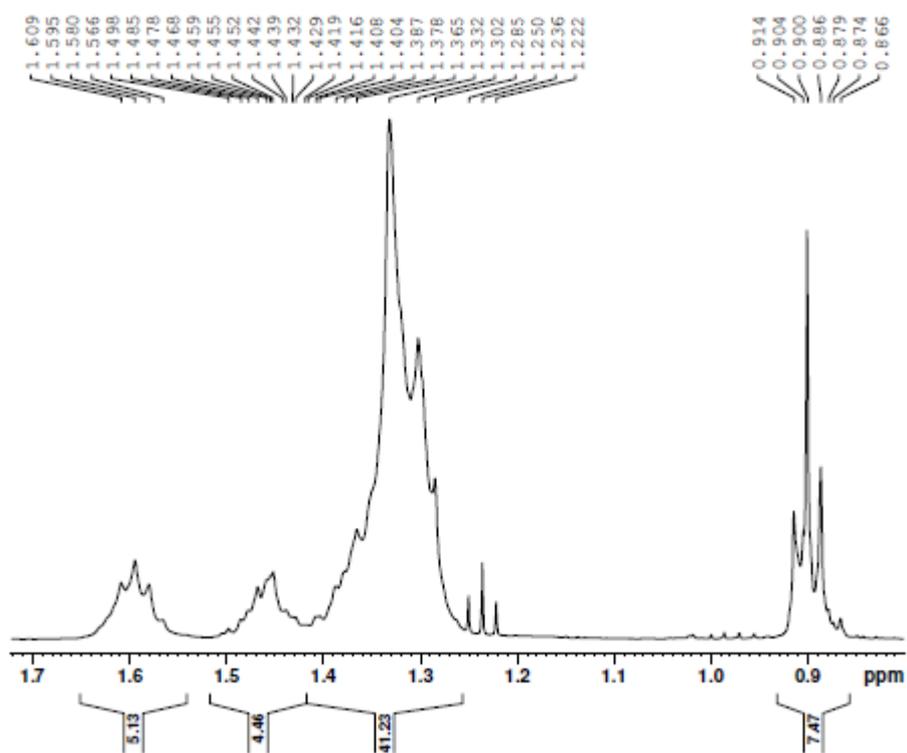
ANEXO IV: Ampliação entre as regiões 3,2 e 3,8 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)



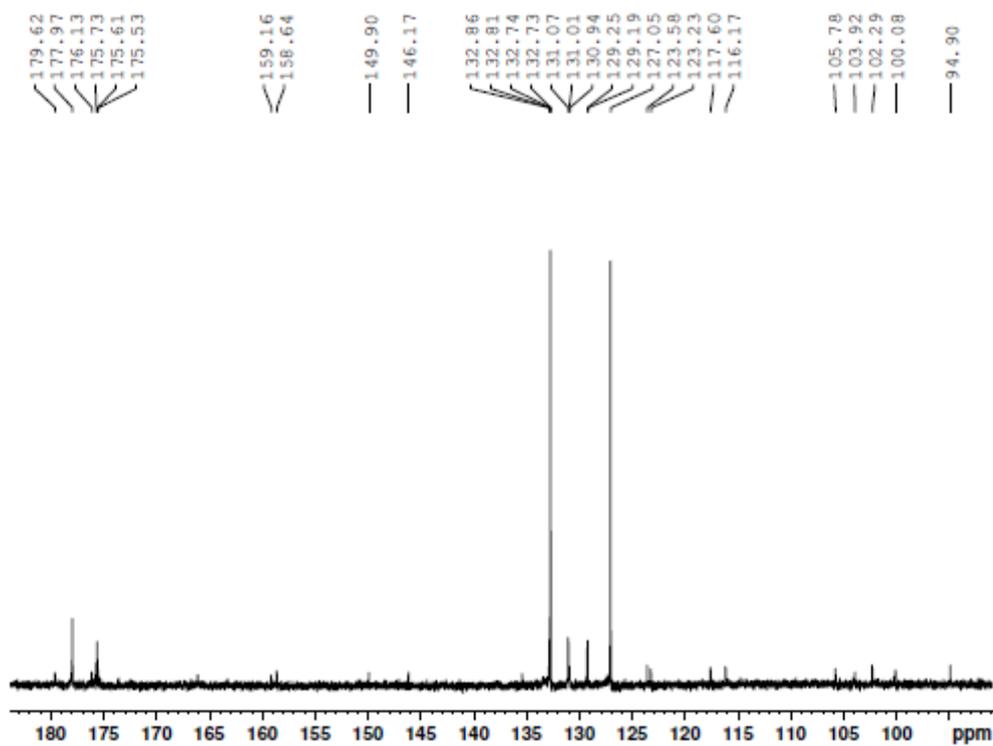
ANEXO V: Ampliação entre as regiões 2,0 e 2,4 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)



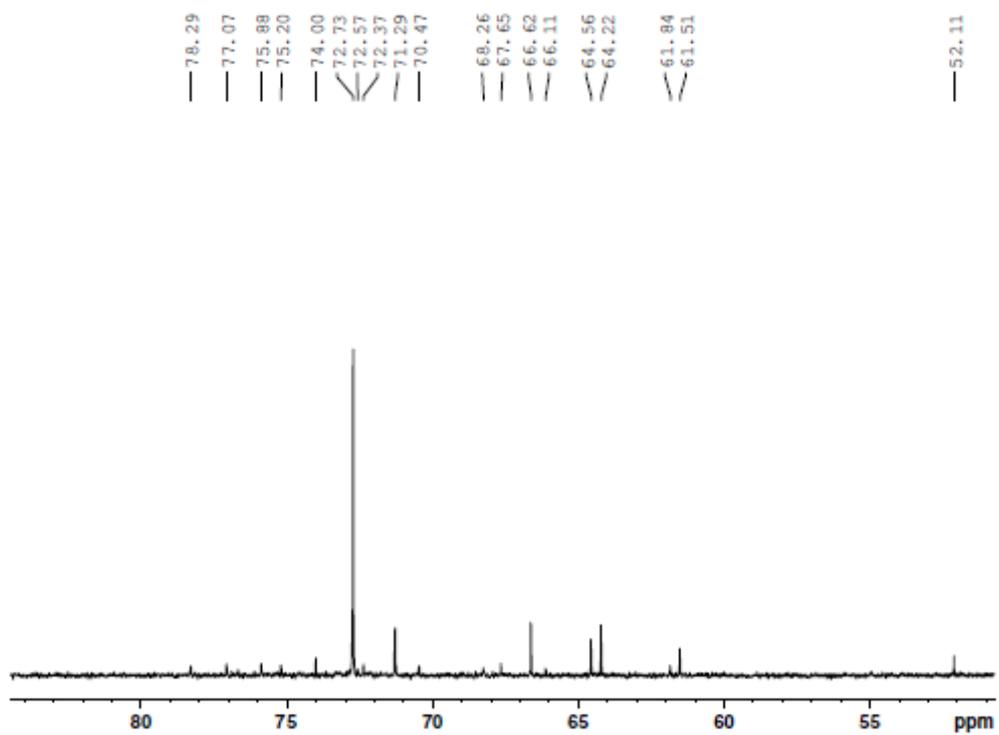
ANEXO VI: Ampliação entre as regiões 0,8 e 1,7 ppm do espectro de RMN de ^1H do éster da rutina (500 MHz, MeOD)



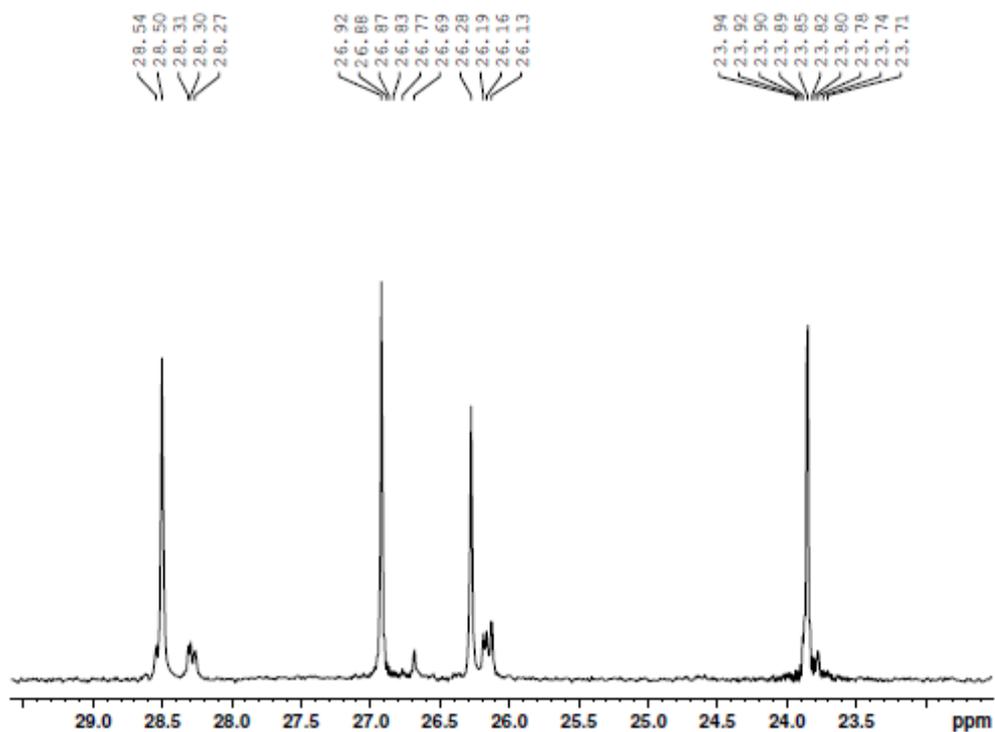
ANEXO VII: Ampliação entre as regiões 90 e 180 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (125 MHz, MeOD)



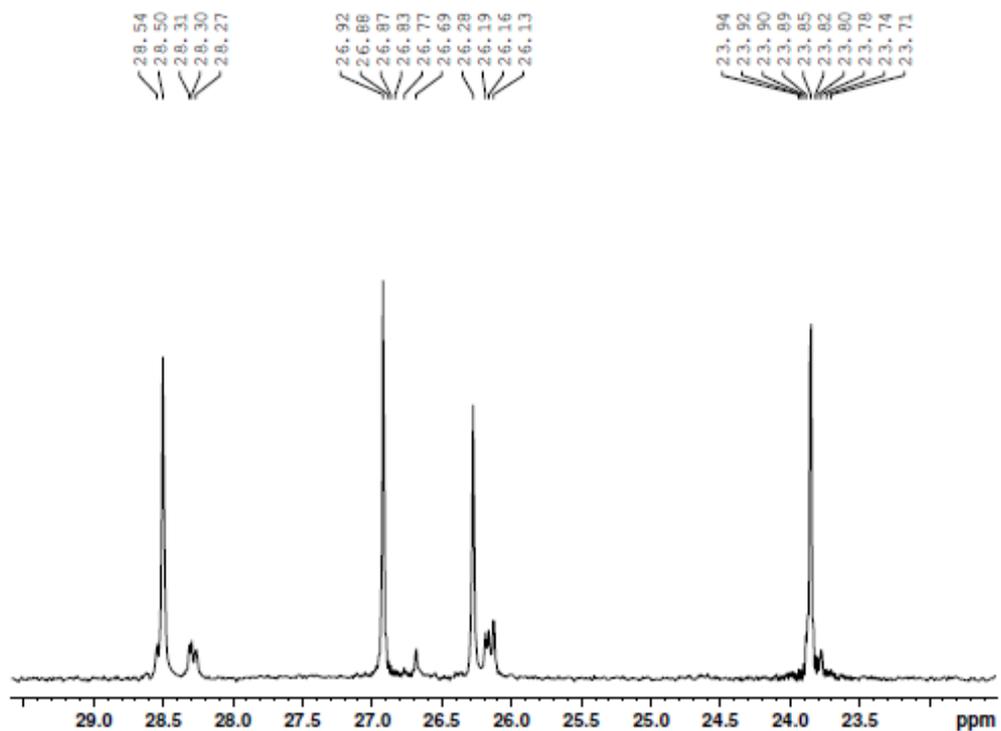
ANEXO VIII: Ampliação entre as regiões 50 a 80 ppm do espectro de RMN de ^{13}C
do éster da rutina (500 MHz, MeOD)

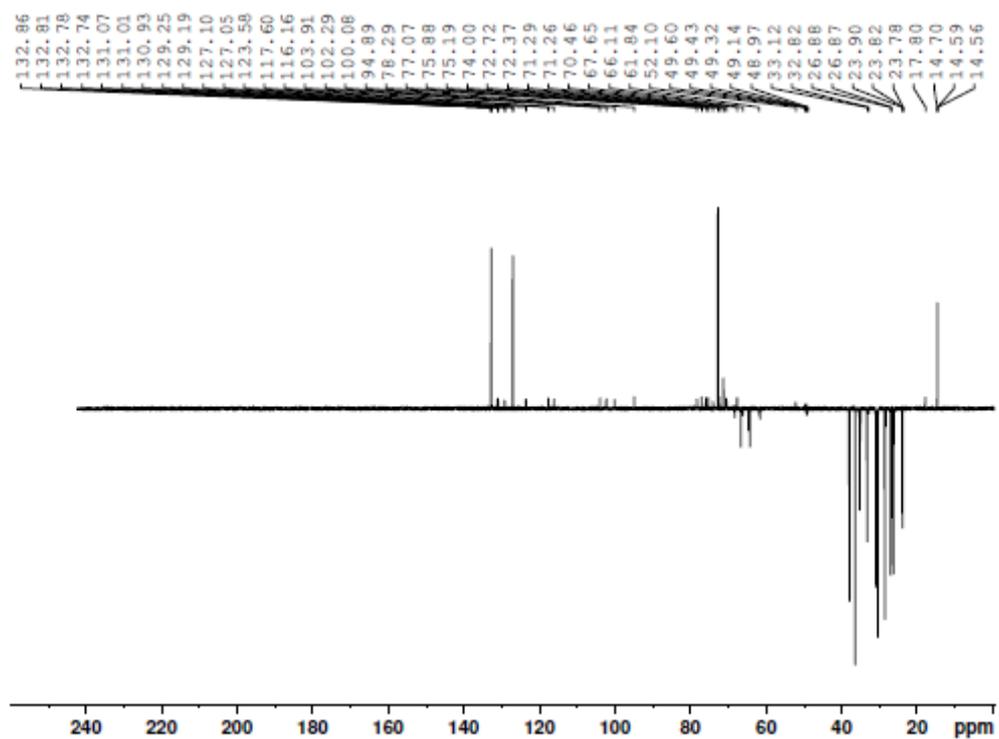


ANEXO IX: Ampliação entre as regiões 30 a 38 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (500 MHz, MeOD)

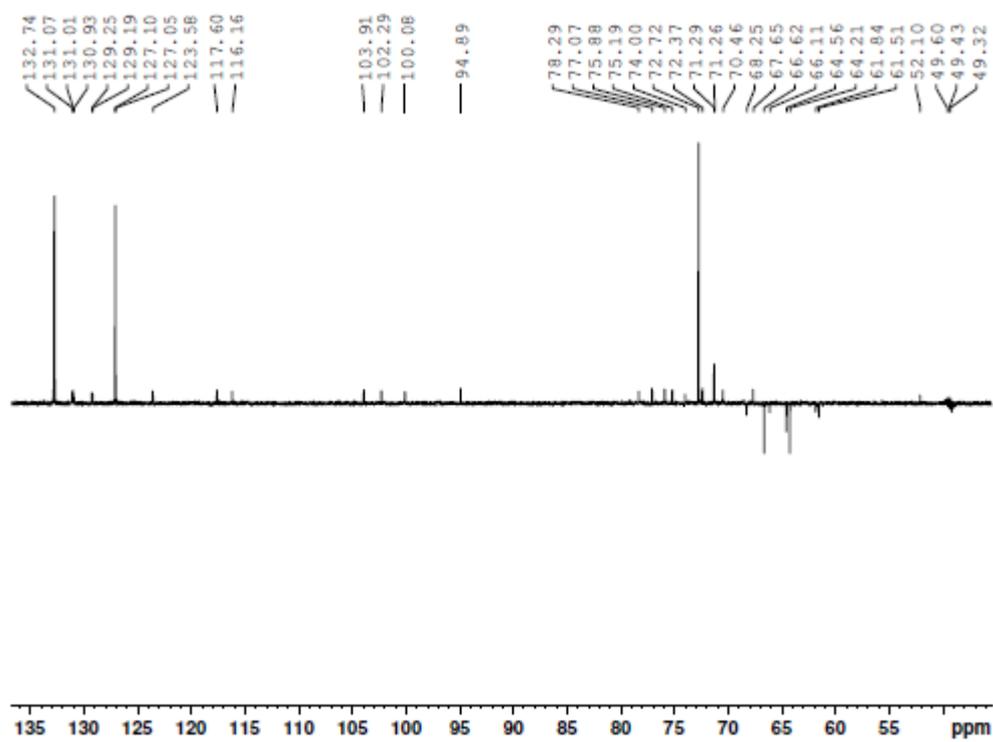


ANEXO X: Ampliação entre as regiões 23 a 29 ppm do espectro de RMN de ^{13}C do éster da rutina (500 MHz, MeOD)

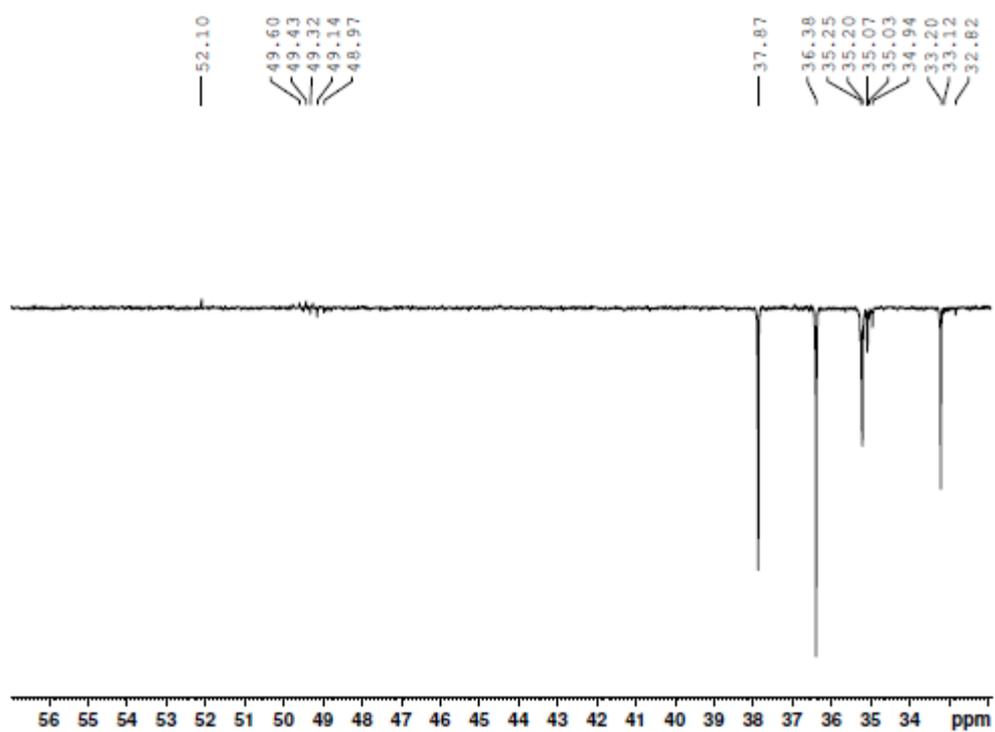


ANEXO XI: Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)

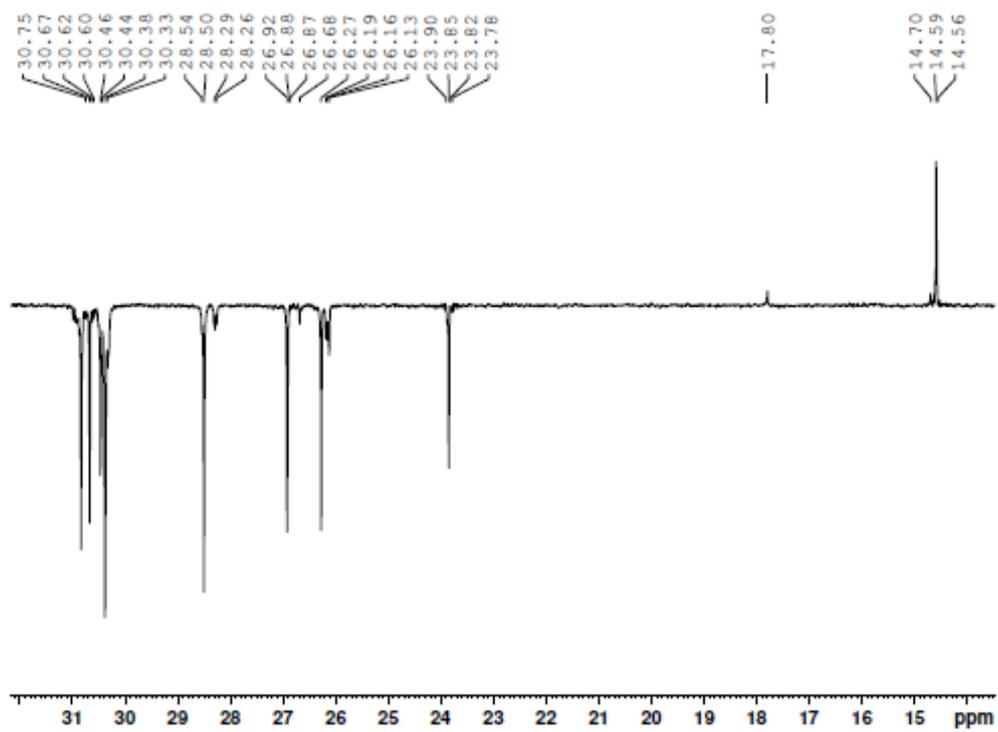
ANEXO XII: Ampliação 49 a 135 ppm dos espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)



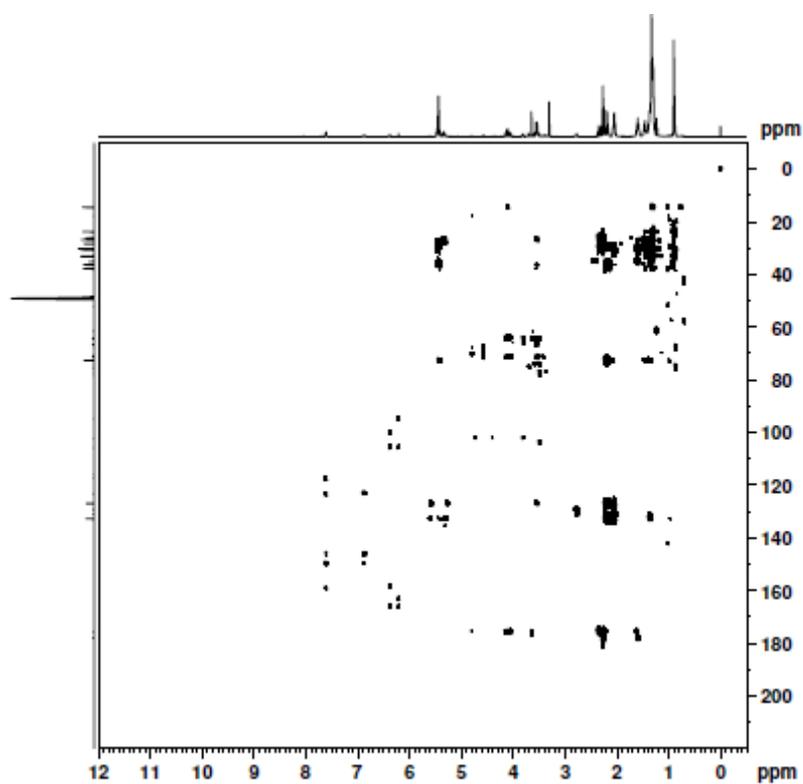
ANEXO XIII: Ampliação 32 a 56 ppm dos espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster rutina (125 MHz, MeOD)



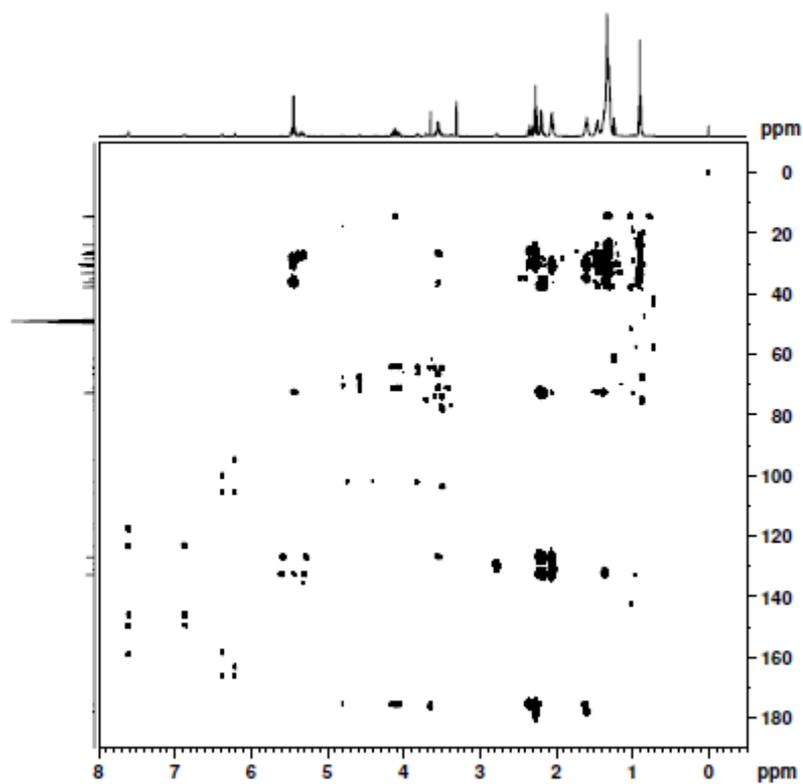
ANEXO XIV: Ampliação 14 a 31 ppm dos espectros ^1H , ^{13}C e DEPT-135 do éster
rutina (125 MHz, MeOD)



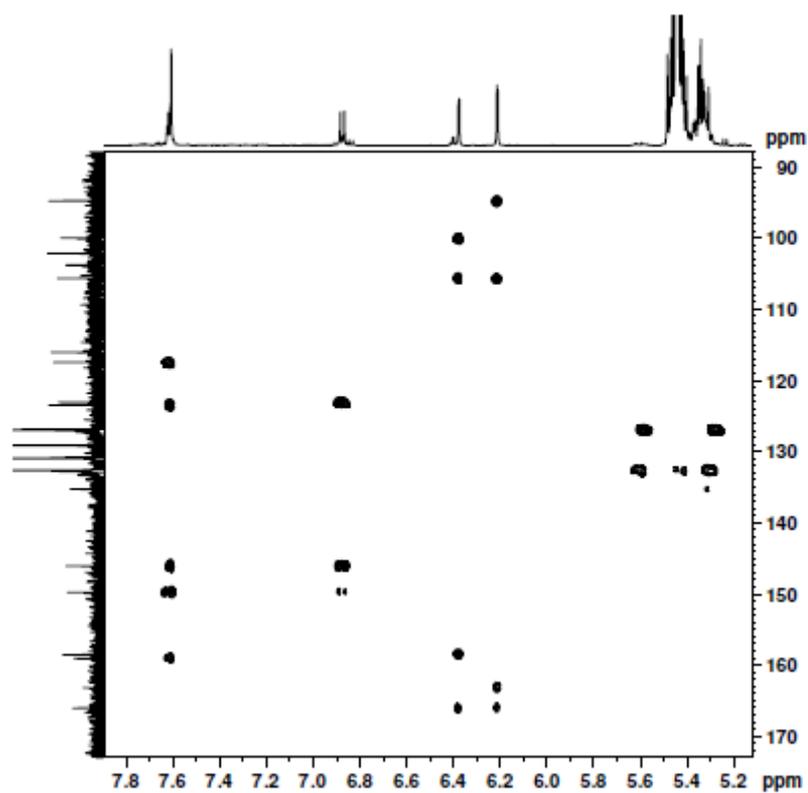
ANEXO XV: Espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



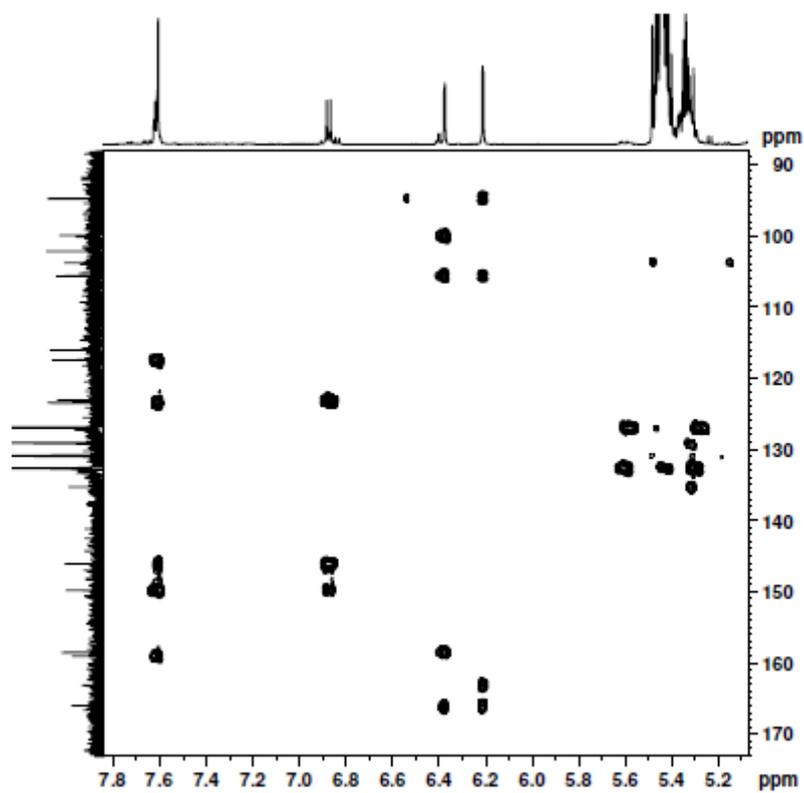
ANEXO XVI: Ampliação ^1H : 0 a 8,0 e ^{13}C : 0 a 180 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



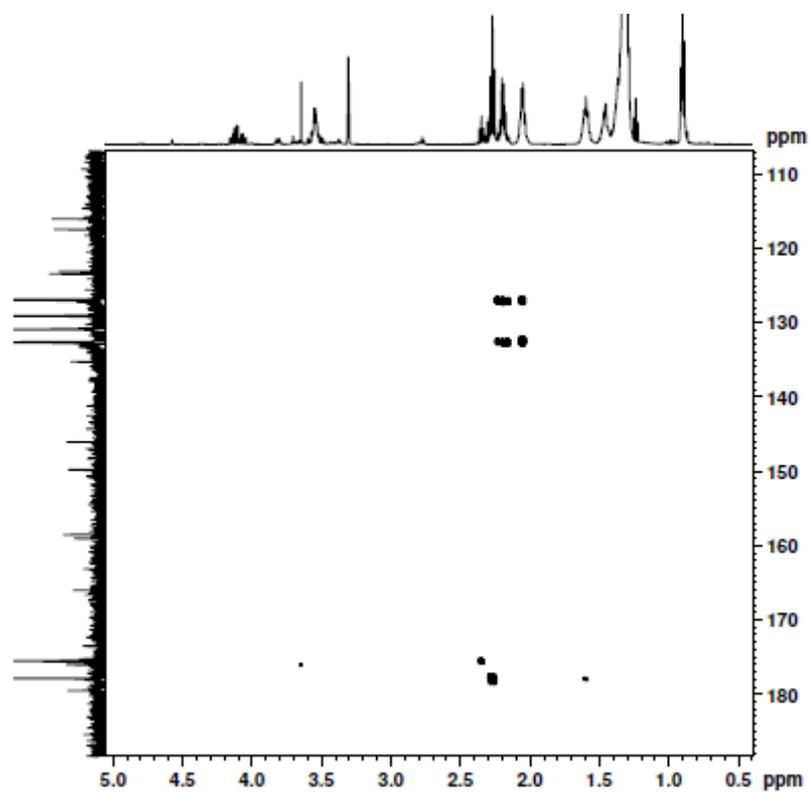
ANEXO XVII: Ampliação ^1H : 5,2 a 7,8 e ^{13}C : 90 a 170 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



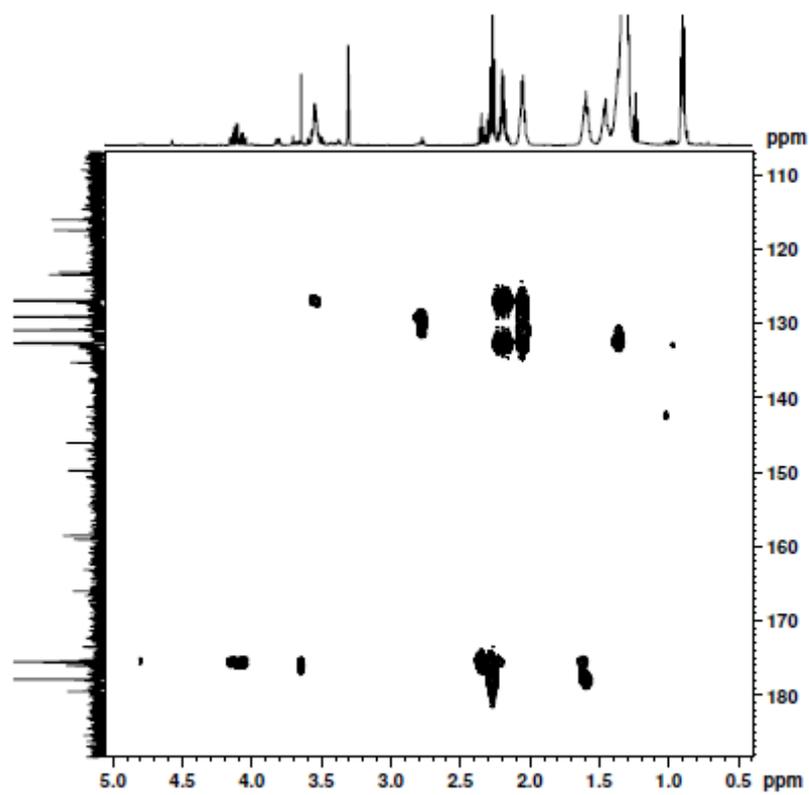
ANEXO XVIII: Ampliação (2) ^1H : 5,2 a 7,8 e ^{13}C : 90 a 170 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



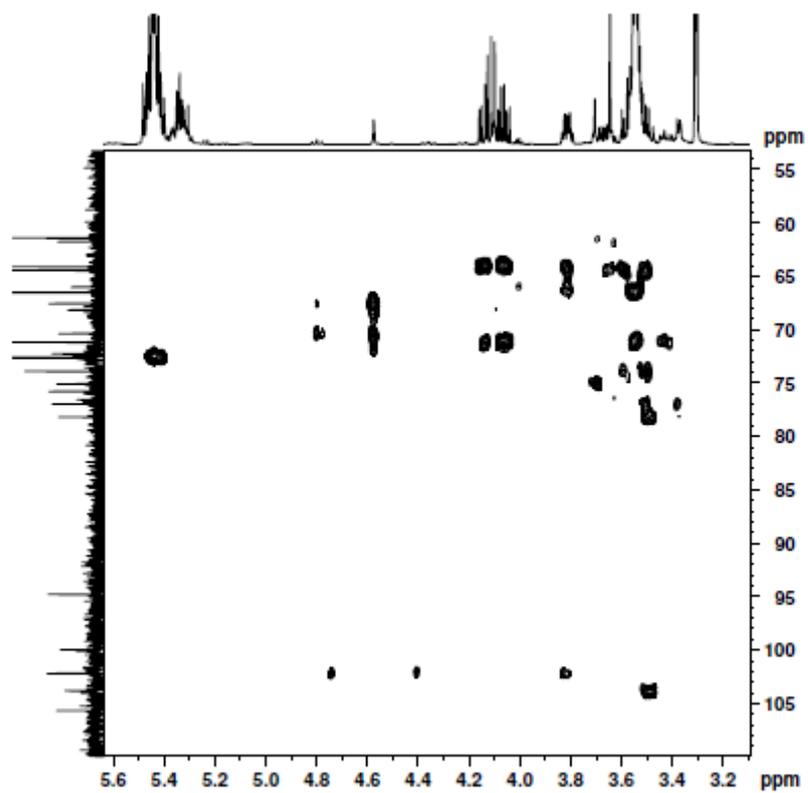
ANEXO XIX: Ampliação ^1H : 0,5 a 5,0 e ^{13}C : 110 a 180 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



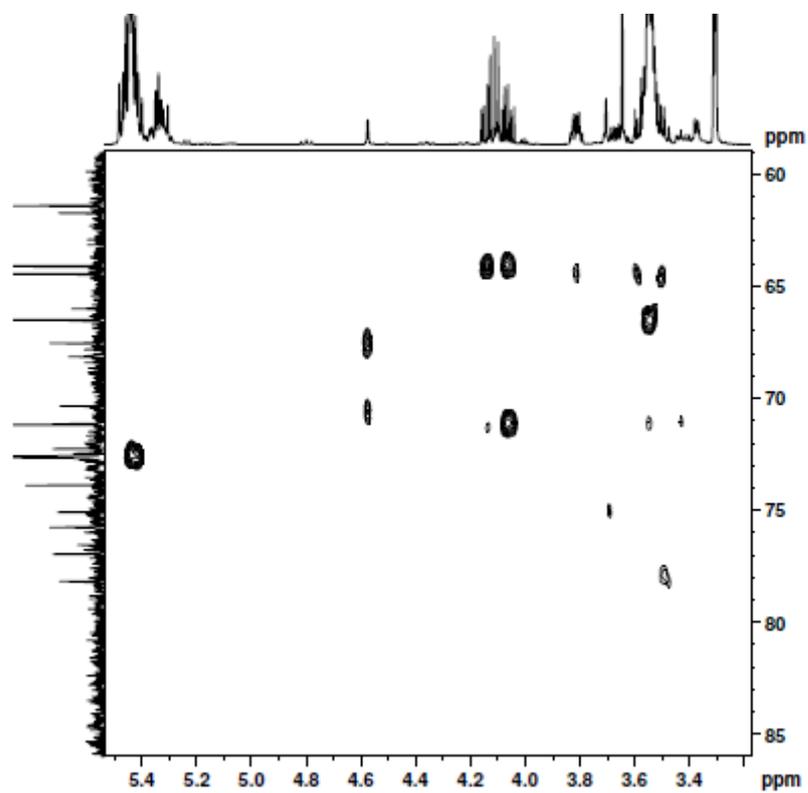
ANEXO XX: Ampliação (2) ^1H : 0,5 a 5,0 e ^{13}C : 110 a 180 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



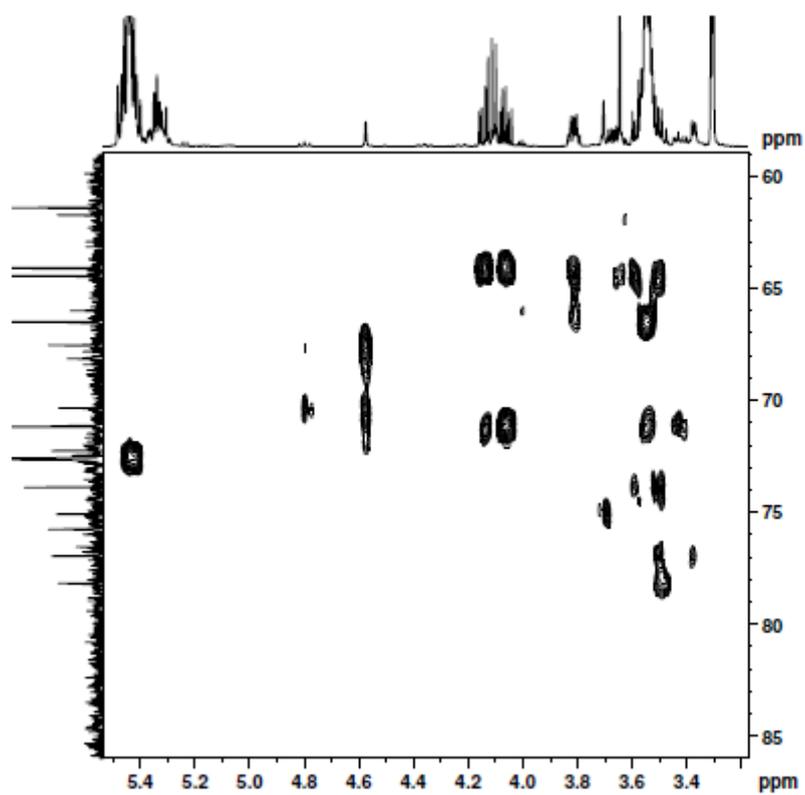
ANEXO XXI: Ampliação ^1H : 3,2 a 5,6 e ^{13}C : 55 a 105 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



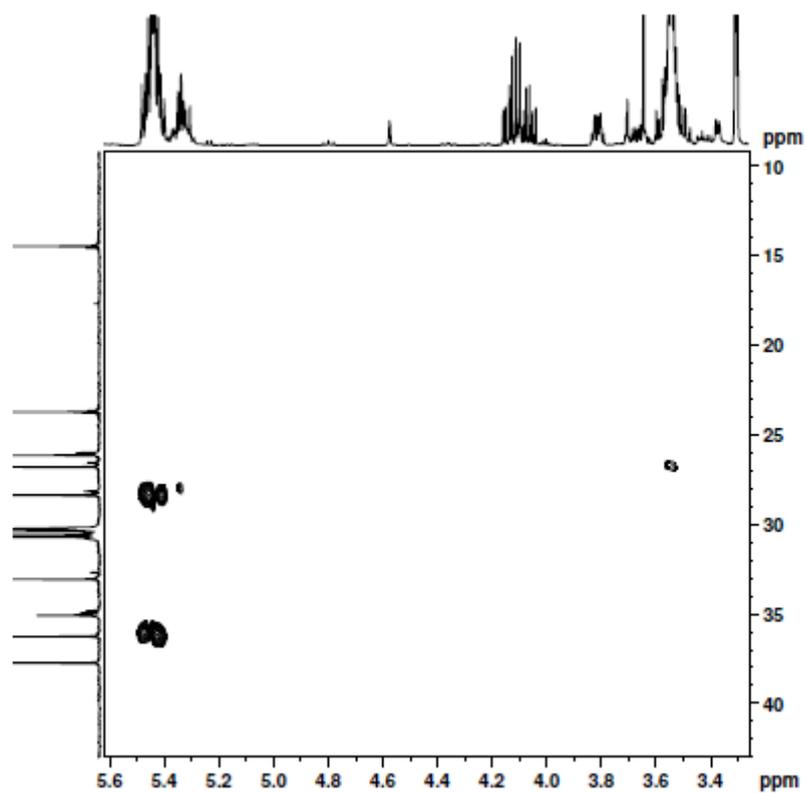
ANEXO XXII: Ampliação ^1H : 3,4 a 5,4 e ^{13}C : 60 a 85 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



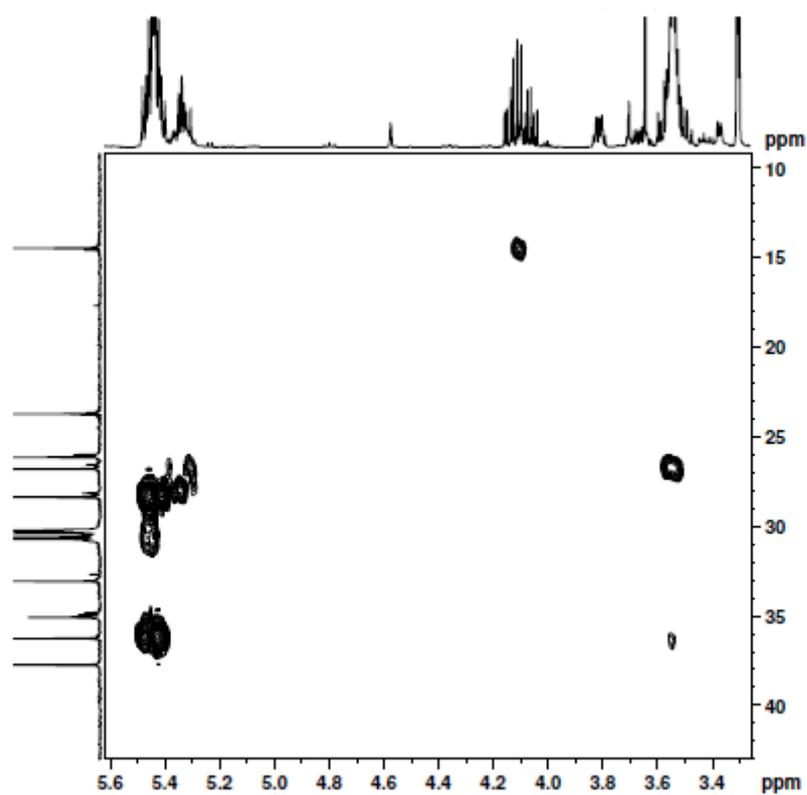
ANEXO XXIII: Ampliação (2) ^1H : 3,4 a 5,4 e ^{13}C : 60 a 85 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



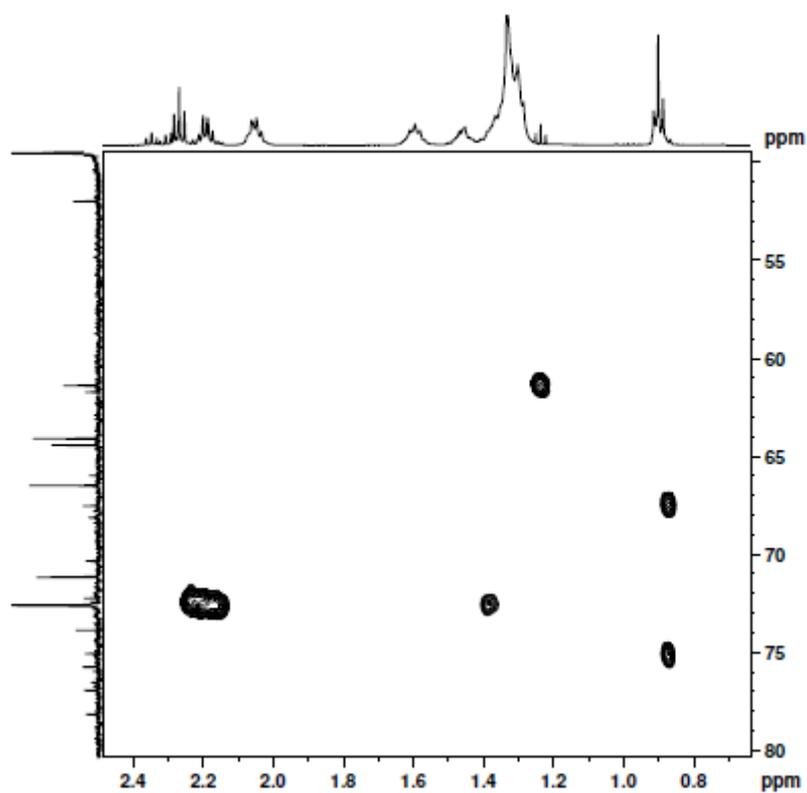
ANEXO XXIV: Ampliação ^1H : 3,4 a 5,6 e ^{13}C : 10 a 40 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



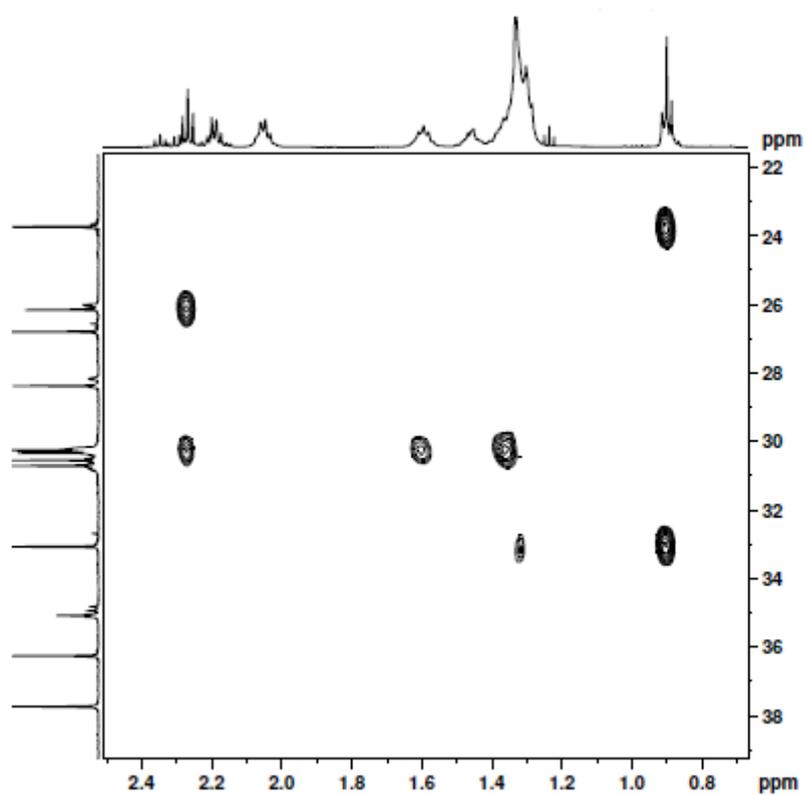
ANEXO XXV: Ampliação (2) ^1H : 3,4 a 5,6 e ^{13}C : 10 a 40 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



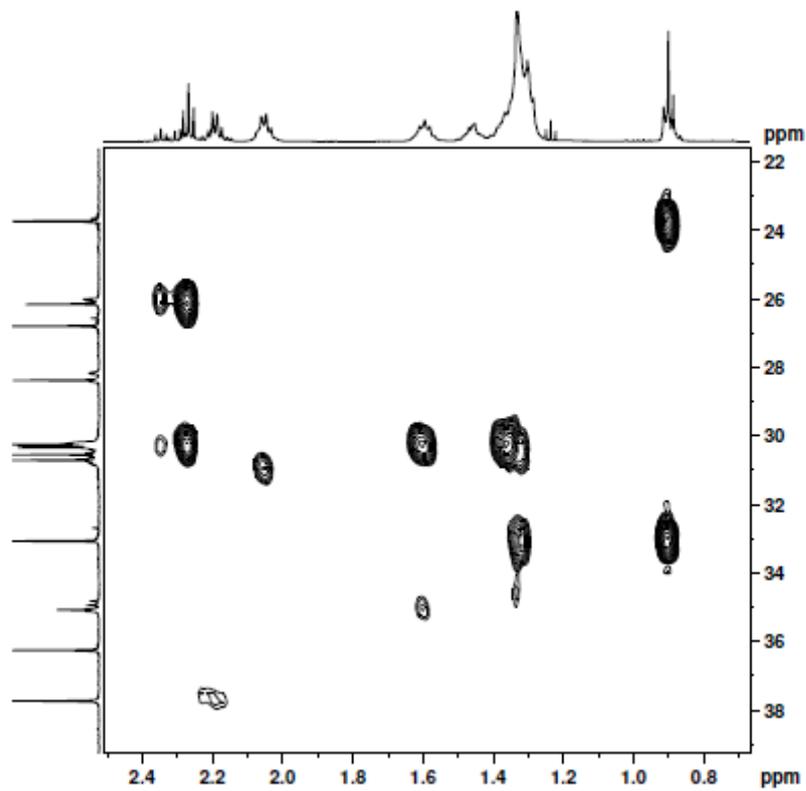
ANEXO XXVI: Ampliação ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 55 a 80 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



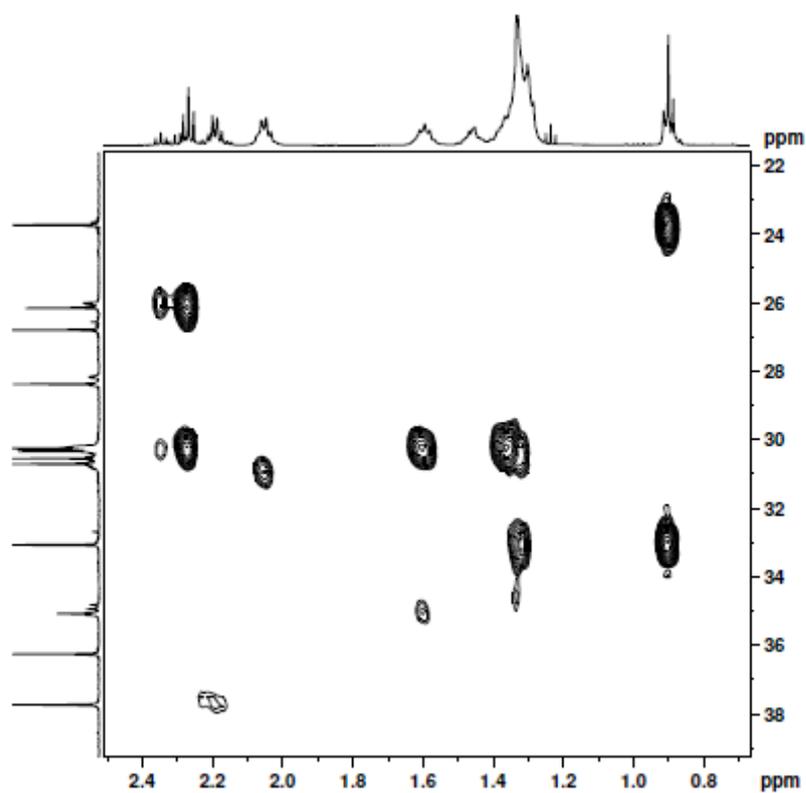
ANEXO XVII: Ampliação ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



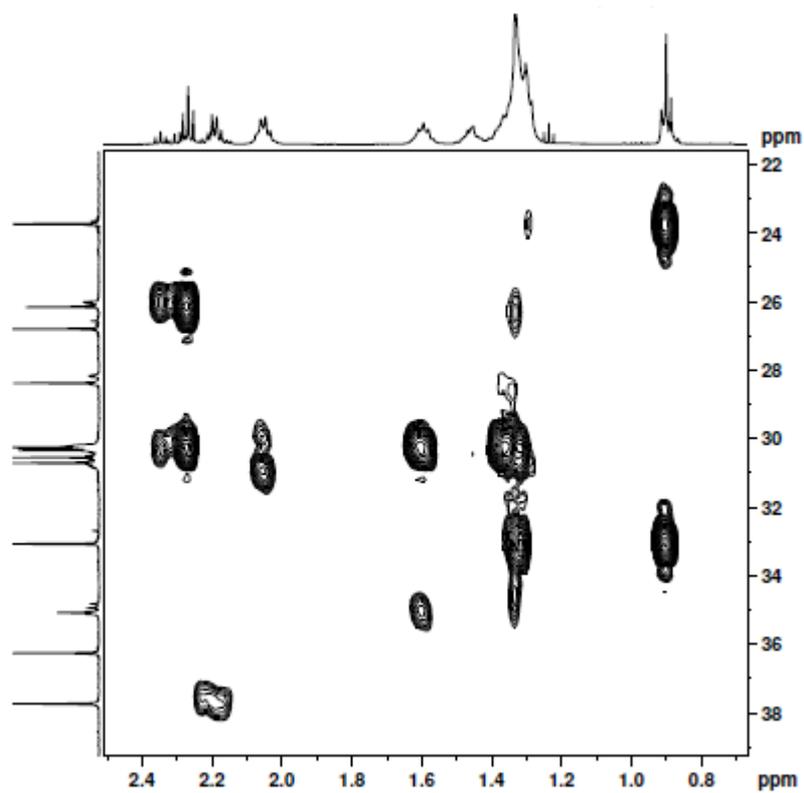
ANEXO XXVIII: Ampliação (2) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



ANEXO XIX: Ampliação (3) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)

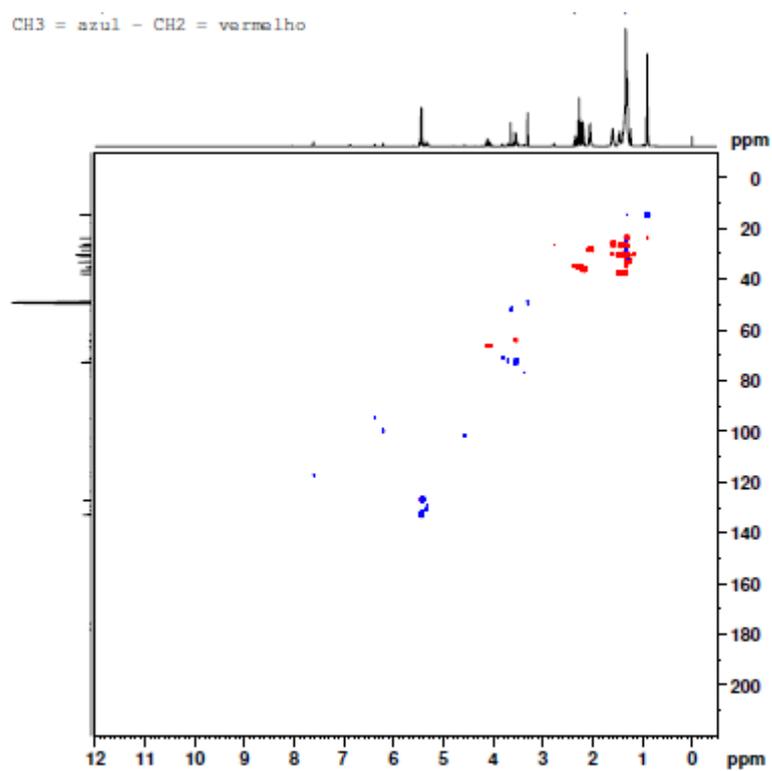


ANEXO XXX: Ampliação (4) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 22 a 38 ppm do espectro de HMBC do éster rutina (125 MHz, MeOD)

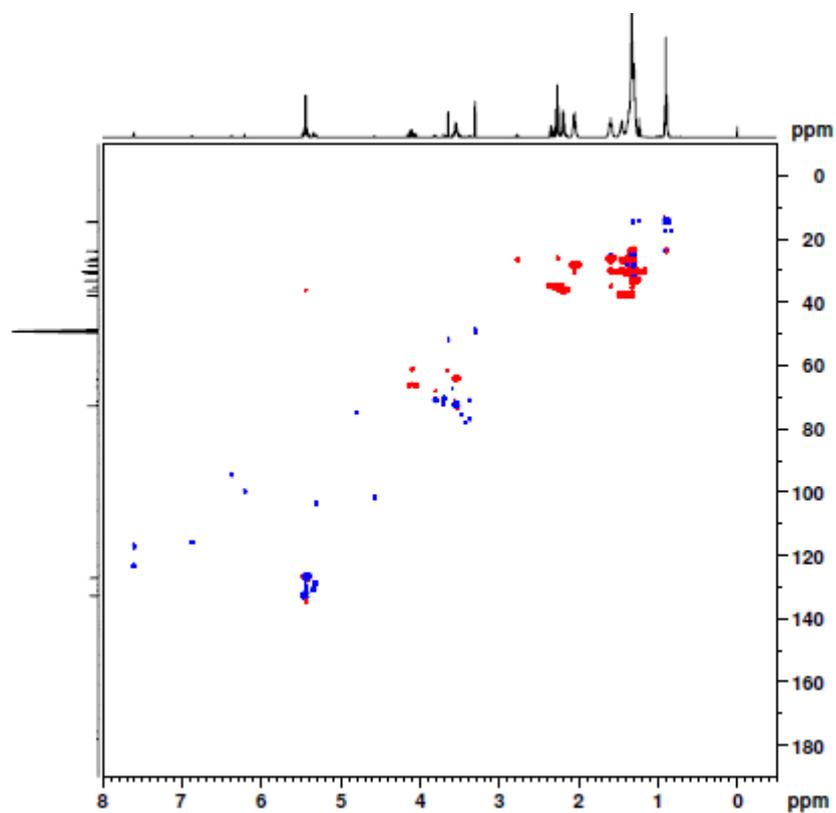


ANEXO XXXI: Espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)

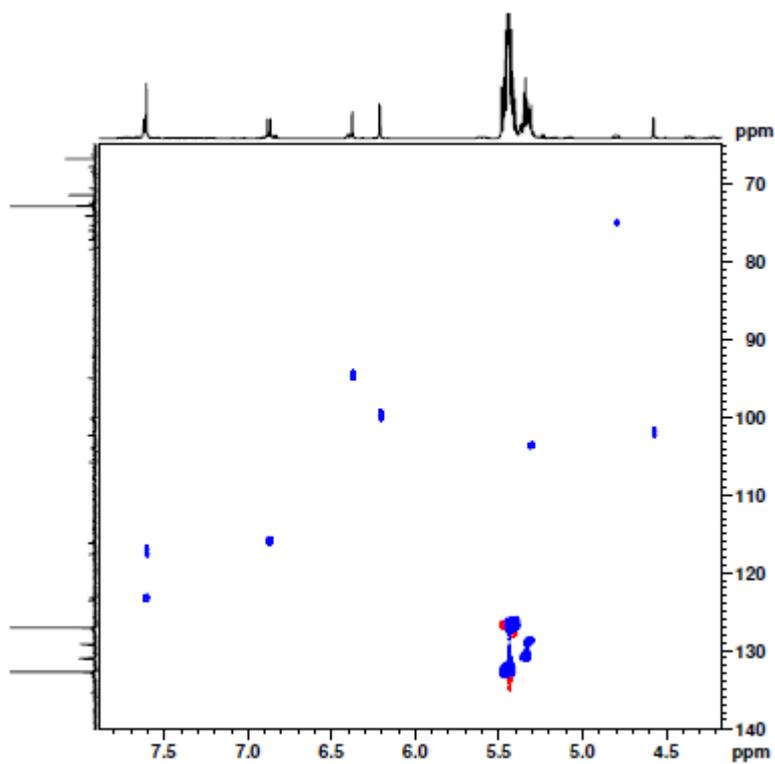
HSQC - CH, CH3 = azul - CH2 = vermelho



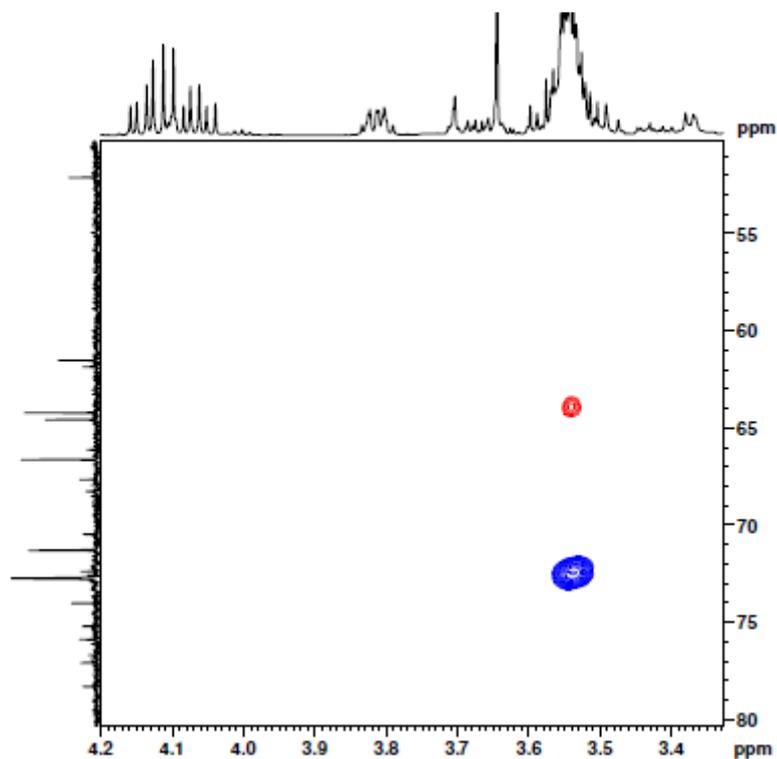
ANEXO XXXII: Ampliação ^1H : 0 a 8,0 e ^{13}C : 0 a 180 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



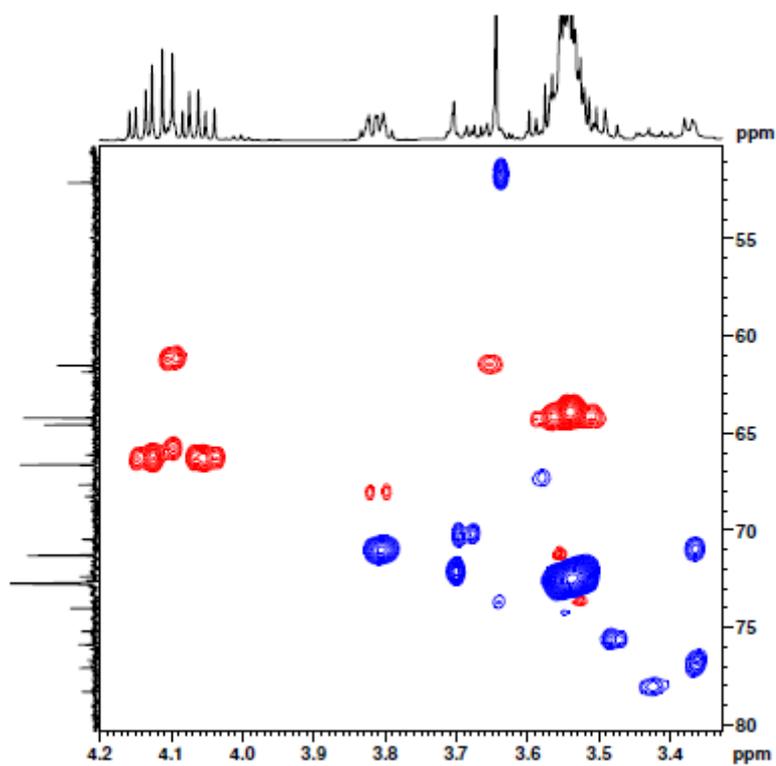
ANEXO XXXIII: Ampliação ^1H : 4,5 a 7,5 e ^{13}C : 70 a 140 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



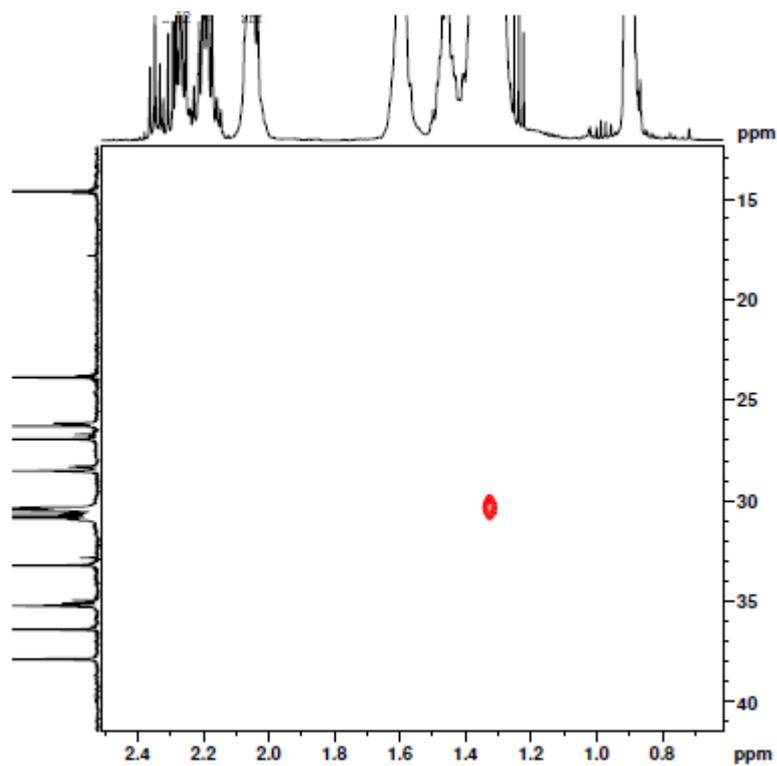
ANEXO XXXIV: Ampliação ^1H : 3,4 a 4,2 e ^{13}C : 55 a 80 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



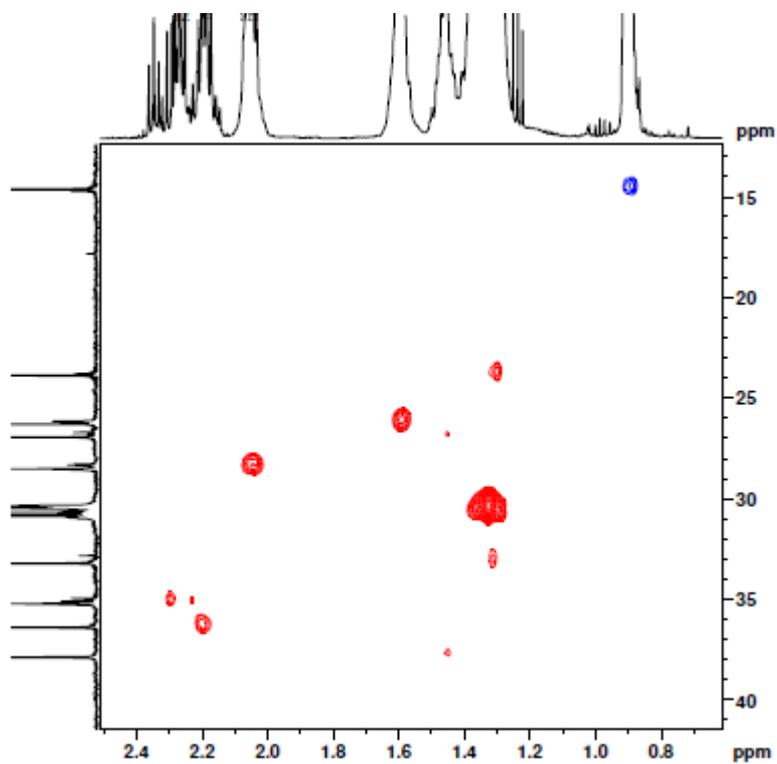
ANEXO XXXV: Ampliação (2) ^1H : 3,4 a 4,2 e ^{13}C : 55 a 80 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



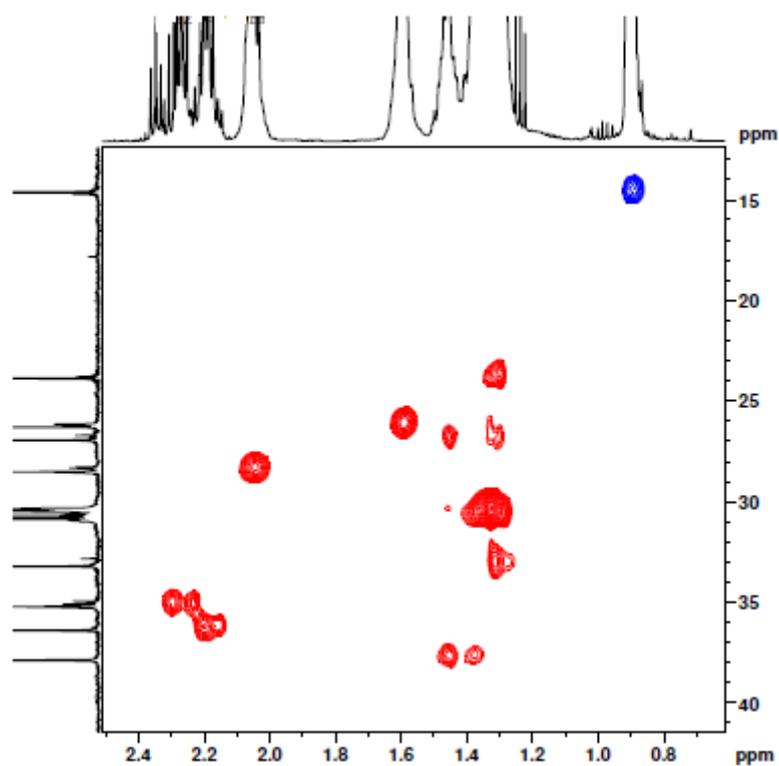
ANEXO XXXVI: Ampliação ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



ANEXO XXXVII: Ampliação (2) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



ANEXO XXXVIII: Ampliação (3) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)



ANEXO XXXIX: Ampliação (4) ^1H : 0,8 a 2,4 e ^{13}C : 15 a 40 ppm do espectro de HSQC do éster rutina (125 MHz, MeOD)

