



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**VERÔNICA MARCHESINE DE ALMEIDA**

**ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DE NARINGINA COM O ÁCIDO 12-  
HIDRÓXI-9-Z-OCTADECENÓICO, CATALISADA POR LIPASE B  
DE *Candida antarctica***

Feira de Santana, BA

2011

**VERÔNICA MARCHESINE DE ALMEIDA**

**ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DE NARINGINA COM O ÁCIDO 12-  
HIDRÓXI-9-Z-OCTADECENÓICO, CATALISADA POR LIPASE B  
DE *Candida antarctica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Branco

Feira de Santana, BA

2011

# **BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Arthur José Mascarenhas**  
(Universidade Federal da Bahia)

**Dr. Jorge Maurício David**  
(Universidade Federal da Bahia)

**Dr. Alexsandro Branco**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana - BA**  
**2011**

## AGRADECIMENTOS

Ao Criador e à força que rege e provém todas as situações e oportunidades que ocorrem em nossas vidas.

Ao meu orientador, Prof. Alexandro Branco, pelo apoio, auxílio, orientação e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos pais, por todo esforço para comigo e principalmente pelo caráter e boa educação ensinados. Devo minhas vitórias e conquistas a vocês, a quem tenho eterna gratidão.

Às minhas lindas irmãs e toda minha família, pelo incentivo constante e por todos os momentos maravilhosos que sempre me proporcionam.

Ao meu companheiro Toni, por me acompanhar em todos os momentos e pelo seu amor.

À prof<sup>a</sup> Carla pelo auxílio nas análises por CLAE-DAD sempre com paciência e boa vontade.

À prof<sup>a</sup> Sandra, por ceder gentilmente o shaker em que foram desenvolvidos os experimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Fitoquímica pelo apoio e ensinamentos, especialmente a Sarah, Jenner e Fernanda Fonseca, pessoas que me auxiliaram muito no decorrer deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Didático de Biologia pela compreensão e amizade que tornou tudo mais fácil.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ-Ba.

“Deus me conceda falar com propriedade e pensar de forma correspondente aos dons que me foram dados, porque ele é o guia da sabedoria e o orientador dos sábios. Em seu poder estamos nós, as nossas palavras, a nossa inteligência e as nossas habilidades”.

Sabedoria 7, 15-16.

## RESUMO

Flavonoides glicosilados são compostos importantes entre os produtos naturais. Possuem atividade biológica variada, principalmente antioxidante, entretanto apresentam baixa solubilidade e estabilidade em meio lipofílico, dificultando seu uso nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. Afim de melhorar essas propriedades, a acilação enzimática de flavonoides glicosídeos com ácidos graxos utilizando lipase B imobilizada de *Candida antarctica* tem sido sugerida como um caminho interessante, por não alterar sua atividade biológica. O objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho das reações de esterificação e transesterificação através da acilação enzimática de naringina com ácido ricinoleico e óleo de mamona, respectivamente. O ácido ricinoleico (ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenoico) é um ácido graxo hidróxi-insaturado encontrado no óleo de mamona. A síntese enzimática do éster da naringina foi realizada em incubadora de aquecimento sob agitação a 50 °C durante 120 horas em acetona previamente seca. As reações foram monitoradas quantitativamente por CLAE-DAD. O éster produzido foi purificado por extração líquido-líquido, seguido por cromatografia em coluna. Os resultados obtidos indicaram que a reação de transesterificação obteve maior rendimento de conversão (33%) em relação à esterificação (24%). Estas reações também foram realizadas para comparar o aquecimento convencional e através da energia de micro-ondas. Todos os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises por RMN mostraram que a naringina foi esterificada na OH primária da posição C-6". A viabilidade da acilação enzimática de naringina com ácido graxo hidróxi-insaturado do óleo de mamona foi claramente demonstrada neste trabalho.

**Palavras-chave:** naringina; lipase; esterificação; meio orgânico, óleo de mamona.

## ABSTRACT

Flavonoid glycosides are very important compounds among natural products. They show several biological activities, mainly scavenger. They are characterized by a low solubility and stability in lipophilic media. So its use has been difficult in pharmaceutical, cosmetic and food preparation. In order to take advantage of these properties, the enzymatic acylation of these molecules employing fatty acids and immobilized lipase B from *Candida antarctica* has been suggested as an interesting route because don't affect the biological activities. The aim of this work was to compare the performance of the esterification and transesterification reactions during the enzymatic acylation of naringin with ricinoleic acid and castor oil, respectively. The ricinoleic acid (12-hydroxy-9-Z-octadecenoic acid) is a hydroxy-unsaturated fatty acid that naturally occurs in castor oil. The enzymatic synthesis of flavonoid ester was carried out in shaker heating at 50°C under agitation during 120 hours using dry acetone. The reactions were monitored quantitatively by HPLC-DAD. The naringin ester was purified by liquid-liquid extraction followed by column chromatography. The obtained results indicated that the transesterification reactions obtained higher conversion yields (33%) compared to esterification (24%). These reactions also carried out so compare heating source different such as conventional and with microwave energy. All data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's test with 5% level of significance. The NMR analyses show the esterification which takes place on the primary OH of glucose moiety of naringin in C-6" position. The feasibility of the enzymatic acylation of naringin with a hydroxyl-unsaturated fatty acid from castor oil was clearly demonstrated in this work.

**Key words:** naringin; lipase; esterification; organic medium; castor oil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de reação da lipase catalisando hidrólise ou esterificação.	16
<b>Figura 2:</b> Estrutura tridimensional da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (E.C.3.1.1.3 - Triaciglicerol Hidrolase). Obtida por difração de raios-X, resolução: 2,10 Å. PDB: 1LBT.	18
<b>Figura 3:</b> Esqueleto básico de flavonoide e suas diferentes classes.	20
<b>Figura 4:</b> Naringina (7, 5, 4'-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo)	22
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da acilação enzimática: (a) esterificação; (b) transesterificação.	24
<b>Figura 6:</b> Mecanismo de reação da acilação de flavonóide (F) catalisada por CAL B, evidenciando os dois intermediários tetraédricos e o complexo acil enzimático.	25
<b>Figura 7:</b> 1. Frutos da mamoneira; 2. Sementes de mamona	36
<b>Figura 8:</b> Ricinoleína, principal triglicérido do óleo de mamona	37
<b>Figura 9:</b> Ácido ricinoléico (ácido 12-hidróxi-9-cis-octadecenoico).	37
<b>Figura 10:</b> Cromatograma do ácido ricinoléico obtido por CG após derivatização	46
<b>Figura 11:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenoico. TMS como referência interna (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	47
<b>Figura 12:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenoico. TMS como referência interna (100MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	47
<b>Figura 13:</b> Espectro de HMQC do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenoico (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )	49
<b>Figura 14:</b> Espectro de HMBC do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenoico (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )	50
<b>Figura 15:</b> Estrutura química enumerada do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenoico	51
<b>Figura 16:</b> Cromatoplaça da reação em micro-ondas, ao longo de 12 horas.	53
<b>Figura 17:</b> Cromatograma da substância padrão naringina obtido por CLAE-DAD em metanol (1 Naringina; 2 e 3 Impurezas presentes na substância padrão).	54
<b>Figura 18:</b> Perfil químico da reação de acilação enzimática da naringina com ácido ricinoléico obtido por CLAE-DAD em metanol (1: naringina; 2: éster formado durante a reação).	55
<b>Figura 19:</b> Espectros de absorção UV-Vis dos picos identificados no cromatograma da reação de acilação enzimática da naringina obtido por CLAE-DAD.	56

<b>Figura 20:</b> Espectros de absorção UV-Vis identificados no cromatograma da reação de acilação enzimática da naringina (naringina e seu éster) obtido por CLAE-DAD. Os espectros foram obtidos em três diferentes pontos de cada um dos picos e sobrepostos entre si para efeito de comparação de sua similaridade.	58
<b>Figura 21:</b> Rendimento percentual obtido nas reações de acilação enzimática da naringina ao longo de 120 horas, comparando o óleo de mamona e ácido ricinoléico como agente acilante, sob aquecimento convencional.	63
<b>Figura 22:</b> Rendimento percentual obtido nas reações de acilação enzimática da naringina em 12 horas, comparando o óleo de mamona e ácido ricinoléico como agente acilante, sob aquecimento convencional e por micro-ondas.	68
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	69
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	69
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	70
<b>Figura 26:</b> Ampliação entre as regiões 5 a 8 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	70
<b>Figura 27:</b> Ampliação entre as regiões 0 a 5 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	71
<b>Figura 28:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	71
<b>Figura 29:</b> Ampliação entre as regiões 90 a 140 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	72
<b>Figura 30:</b> Ampliação entre as regiões 60 a 85 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	72
<b>Figura 31:</b> Ampliação entre as regiões 10 a 50 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	73
<b>Figura 32:</b> Espectro de correlação HSQC da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	75
<b>Figura 33:</b> Espectro de correlação HMBC da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	75
<b>Figura 34:</b> Espectro de correlação HSQC do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	76
<b>Figura 35:</b> Espectro de correlação HMBC do éster da naringina (500MHz, $\text{DMSO}_d_6$ )	76
<b>Figura 36:</b> Acilação enzimática da naringina (1) com o ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico (2) e o éster produzido na reação (3).	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Posição de acilação por CAL B em flavonóides glicosilados.	33
<b>Tabela 2:</b> Variação do teor de ácidos graxos no óleo de mamona.	38
<b>Tabela 3:</b> Condições reacionais empregadas em shaker e micro-ondas.	43
<b>Tabela 4:</b> Gradiente de solventes utilizados na análise por CLAE-DAD.	44
<b>Tabela 5:</b> Dados de RMN para o ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico.	51
<b>Tabela 6:</b> Concentração percentual de éster formado na reação de acilação ao longo de 120 horas.	60
<b>Tabela 7:</b> Teste de Tukey para a variável concentração, da reação de acilação enzimática da naringina com o ácido ricinoléico ao longo de 120 horas.	61
<b>Tabela 8:</b> Teste de Tukey para a variável concentração, da reação de acilação enzimática da naringina com o óleo de mamona ao longo de 120 horas.	62
<b>Tabela 9:</b> Concentração percentual de éster formado na reação de acilação ao longo de 12 horas.	64
<b>Tabela 10:</b> Teste de Tukey para a variável concentração da reação de acilação enzimática da naringina, no período de 12 horas.	66
<b>Tabela 11:</b> Teste de Tukey para a reação de acilação enzimática da naringina no período de 12 horas, comparando diferentes fontes de aquecimento.	67
<b>Tabela 12:</b> Dados de RMN para comparação entre a naringina e seu éster.	78
<b>Tabela 13:</b> Alterações nos deslocamentos químicos da RMN 13C na região glicosídica para a naringina e seu éster.	79

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	13
2.1	LIPASE EM SOLVENTE ORGÂNICO UTILIZANDO CAL-B	13
2.1.1	<b>Lipase B de <i>Candida antarctica</i></b>	17
2.2	FLAVONÓIDES	19
2.2.1	<b>Naringina</b>	21
2.3	BIOCATÁLISE DE FLAVONÓIDES GLICOSILADOS EM SOLVENTE ORGÂNICO UTILIZANDO CAL B	22
2.3.1	<b>Condições operacionais que influenciam a biocatálise de flavonóides em solvente orgânico</b>	26
2.4	SUBSTRATOS EMPREGADOS NA BIOCATÁLISE DE FLAVONÓIDES COM LIPASE	31
2.4.1	<b>Características do flavonóide</b>	31
2.4.2	<b>Características do agente acilante</b>	34
2.4.2.1	Óleo de mamona como agente acilante	36
2.4.3	<b>2.4.3 Lipofilicidade e atividade biológica dos flavonóides acil-glicosilados</b>	38
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	41
3.1	REAGENTES	41
3.2	EQUIPAMENTOS	41
3.3	OBTENÇÃO DO ÁCIDO RICINOLÉICO A PARTIR DO ÓLEO DE MAMONA	42
3.4	ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DE NARINGINA	42
3.4.1	<b>Secagem dos constituintes</b>	42
3.4.2	<b>Reação enzimática utilizando naringina e ácidos graxos e óleo de mamona</b>	43

3.5	ANÁLISE CROMATROGRÁFICA	44
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3.7	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE REAÇÃO	45
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	46
4.1	OBTENÇÃO DO ÁCIDO RICINOLÉICO A PARTIR DO ÓLEO DE MAMONA	46
4.2	ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DE NARINGINA E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	52
4.2.1	<b>Estudo comparativo entre as reações de esterificação e transesterificação sob aquecimento convencional</b>	59
4.2.2	<b>Estudo comparativo de reações empregando aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas</b>	63
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO	68
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	80
	<b>REFERÊNCIAS</b>	81
	<b>ANEXO</b> - Valores de área obtidos por CAE-DAD e rendimento proporcional expresso em porcentagem	89

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse em compostos de origem natural devido às suas propriedades biológicas é tão antiga quanto a própria humanidade, pois desde os primórdios as plantas eram a principal forma de tratamento das doenças. Com o advento da química moderna e da farmacologia, vários compostos, como glicosídeos cardiotônicos, antibióticos e alcaloides, puderam ser isolados e identificados, possibilitando estudar melhor suas características e propriedades biológicas. A partir daí as indústrias começaram a se interessar pela produção e comercialização de produtos naturais.

Alguns compostos de origem natural tornaram-se medicamentos, enquanto outros foram melhorados do ponto de vista farmacêutico, ou utilizados como precursores na produção de fármacos. Entretanto, a busca por novos compostos bioativos continua, assim como os estudos que visam transformar compostos já conhecidos, com a finalidade de melhorar suas propriedades farmacológicas e até mesmo farmacotécnicas.

Os flavonoides em especial, possuem destacada atividade antioxidante, o que desperta o interesse em seu uso pelas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos. Contudo, flavonoides glicosilados têm solubilidade limitada em meios lipofílicos e por isso, a alteração em sua estrutura química sem afetar sua atividade biológica, tem sido investigada por diversos autores. Reações enzimáticas são especialmente úteis nestes casos devido à sua quimio, régio e enantiosseletividade (MELLOU et al, 2006).

A biocatálise de flavonoides glicosilados com o intuito de modificar suas propriedades físico-químicas e biológicas têm sido alvo de grande interesse industrial e científico. As transformações enzimáticas, quando aplicadas em condições ideais (temperatura, enzima, substratos e solventes) podem fornecer taxas de conversão superiores a 95% e aumentar de suas propriedades biológicas (WANG et al, 2010).

A lipase B de *Candida antarctica* é uma das enzimas capazes de produzir modificações nos flavonoides, aumentando sua lipofilicidade sem prejudicar sua atividade biológica. Esta enzima é capaz de acilar flavonoides especificamente em sua porção glicosídica, sem afetar o núcleo flavonoide, responsável por sua atividade antioxidante (MELLOU et al, 2005; CHEBIL et al, 2007).

Dentre os flavonoides glicosilados mais estudados, podemos destacar a rutina e a naringina. Esta última, em particular, torna-se interessante para a realização da reação de

acilação, por possuir uma hidroxila primária em sua porção glicosídica, alcoóis primários são sítios preferidos pela CAL B (RIVA, 2002).

Muitos substratos que atuam como agente acilante na biocatálise de flavonoides com CAL B tem sido pesquisados, sendo de particular interesse o uso de ésteres vinílicos e ácidos graxos, por fornecerem melhores rendimentos. Entretanto, poucas reações são descritas na literatura usando ácidos graxos hidróxi-insaturados e óleos vegetais contendo estes ácidos como agente acilante.

Os óleos vegetais são formados por ácidos graxos ligados ao glicerol na forma de triglicerídeos. Predominam na composição dos óleos vegetais, misturas de ácidos graxos, cuja proporção varia com a sua origem. Dentre os principais ácidos graxos encontrados em óleos vegetais, é possível destacar os ácidos láurico, palmítico, esteárico (saturados), oléico, linoléico, linolênico (insaturados), dentre outros (GIOIELLI, 1996).

As sementes de *Ricinus comunis*, planta popularmente conhecida como mamona, constituem uma importante fonte de óleo vegetal. O óleo de mamona possui a peculiaridade de ter o ácido ricinoléico predominando em sua composição, em cerca de 90%. No óleo, este ácido graxo hidróxi monoinsaturado, encontra-se principalmente na forma do triglicerídeo ricinoleína (FREIRE, 2001). Desta forma, a acilação enzimática da naringina com o óleo de mamona tende a produzir um composto majoritário, o ricinoleato de naringina.

Além de investigar a viabilidade da reação de transesterificação, foi desenvolvida em paralelo, sob as mesmas condições, a reação de esterificação utilizando o ácido ricinoléico obtido a partir da hidrólise do óleo de mamona. As reações foram desenvolvidas no período de 120 horas.

As reações de transesterificação e esterificação também foram investigadas, num espaço de tempo menor (12 horas), para comparar o rendimento da reação, sob aquecimento convencional e por meio de irradiação por micro-ondas. A energia de micro-ondas tem sido objeto de interesse por acelerar as reações de biocatálise e aumentar seu rendimento, sem danificar a enzima (BRADDOO et al, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho, foi promover a acilação seletiva da naringina, catalisada por CAL B em solvente orgânico, empregando o ácido 12-hidroxi-octadec-Z-9-enoico (ácido ricinoleico) como agente acilante, isolado ou na forma de triacilglicerol presente no óleo de mamona, podendo-se assim, comparar as reações de esterificação e transesterificação.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LIPASE EM SOLVENTE ORGÂNICO

Nos últimos anos, a utilização de enzimas vem crescendo nos diversos campos de aplicação, tais como a indústria farmacêutica, química, cosmética e de alimentos. Esta utilização ocorreu devido à compreensão da atividade catalítica das enzimas, que em conjunto com a engenharia molecular possibilitou novas aplicações de várias enzimas, como as proteases, acilases, oxidase, amilase, glicosidases, celulasas e lipases (REIS et al, 2009).

Dentre as enzimas mais utilizadas em reações de biocatálise estão as lipases. A versatilidade destas enzimas tem sido explorada para substituir processos existentes, ou para produzir determinados compostos inviáveis de serem obtidos por vias químicas convencionais (TENG et al, 2005; CABRERA et al, 2009).

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Estas enzimas são geralmente encontradas no meio extracelular, favorecendo a sua extração, isolamento e purificação. Em seu ambiente natural, possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilglicerídeos aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria de óleo e de alimentos, e em síntese orgânica de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos para fins farmacêuticos e na química fina (JAEGER; REETZ, 1998; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

As enzimas microbianas são consideradas mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, rendimento de produção elevado, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular devido à ausência de sazonalidade, flutuações e rápido crescimento de micro-organismos em meios de cultivo baratos (HASAN et al, 2006).

Assim, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de micro-organismos, devido às facilidades de controle e aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução de seu custo de obtenção. Os micro-organismos mais utilizados para a produção destas enzimas são os fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Candida* (JAEGER; EGGERT, 2002).

Dentre as principais aplicações industriais de lipases, podemos destacar a indústria oleoquímica; a produção de polímeros biodegradáveis; a indústria têxtil e de detergentes, a transformação de alimentos e melhoria da qualidade e desenvolvimento de sabor; em produtos de padaria, confeitaria e na produção de aroma de queijos; na resolução de misturas racêmicas; como ferramenta de diagnóstico; no processamento do chá; em cosméticos; como biossensores; como desengordurante na produção de couro; no tratamento de esgotos, resíduos e efluentes; na biodegradação de petróleo; na indústria de papel e celulose; e na produção de biodiesel (HASAN et al, 2006).

Além do baixo custo, o grande potencial biotecnológico de lipases microbianas deve-se às suas características singulares tais como: estabilidade em solventes orgânicos, não necessitam de co-fatores, atuam em faixa de pH bastante ampla, atuam com vários tipos de substratos e são estéreo-, quimio- e regio-seletivas (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002).

As reações utilizando lipases ocorrem na interface água-lipídeo podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea. Substratos lipofílicos usualmente formam um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelar e emulsificado, assim, é necessário um modelo de sistema apropriado ao estudo da cinética da lipase. O fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a "ativação interfacial" (TORRES et al, 2005).

Sarda e Desnuelle (1958) propuseram o fenômeno da ativação interfacial após verificar diferenças entre enzimas quanto ao seu comportamento cinético. Os autores observaram que a atividade de esterases se dava em função da concentração do substrato, de acordo com o modelo clássico de Michaelis-Menten, em que a velocidade máxima ocorre antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e da formação de agregados e/ou interfaces. A atividade das lipases foi caracterizada por ser mantida constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançada, aumentando a partir desse ponto. A este fenômeno de aumento de atividade enzimática quando há formação de interfaces, denominou-se "ativação interfacial".

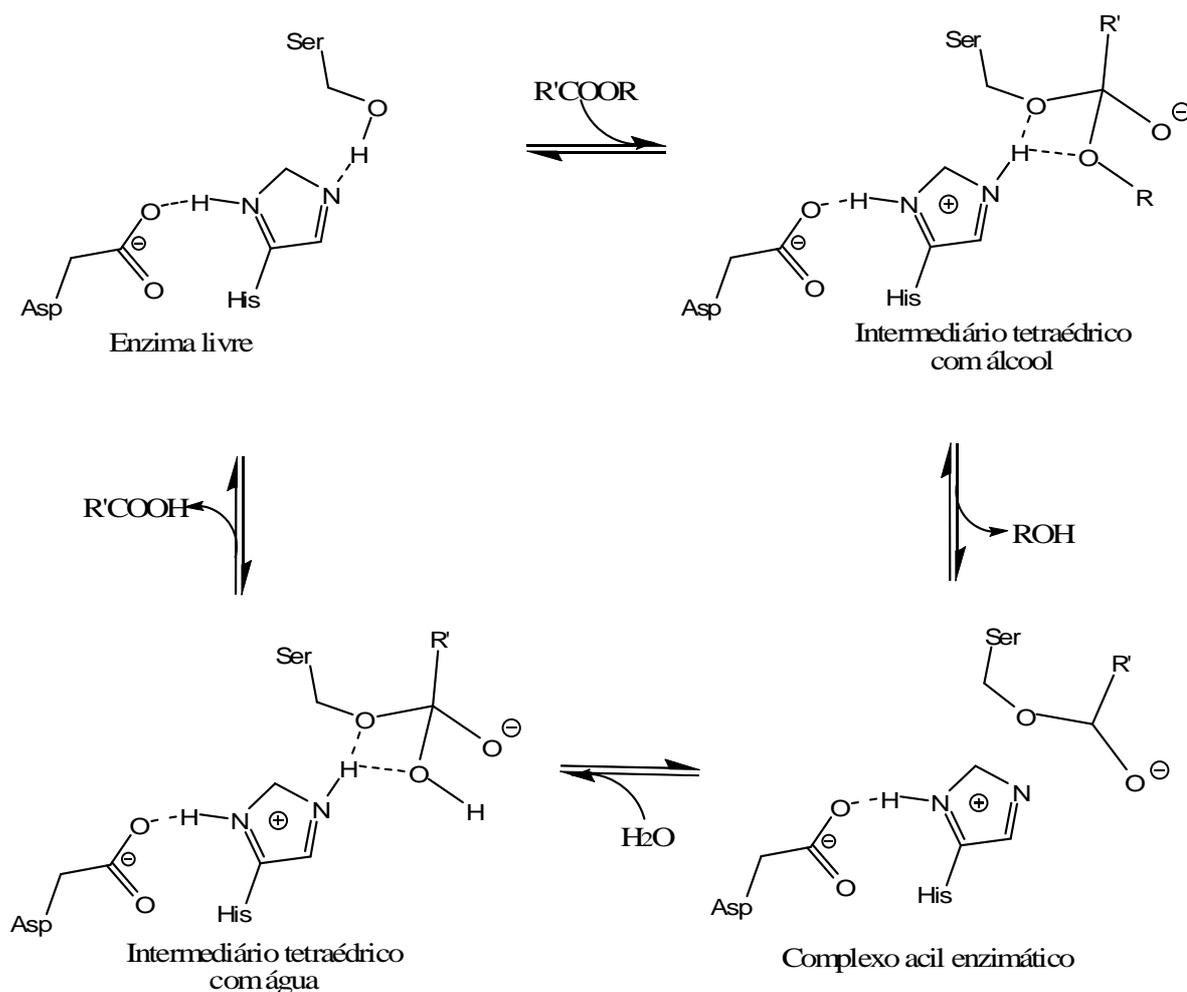
Lipases, diferentemente das esterases, são definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados. A determinação da estrutura tridimensional da lipase também auxilia na compreensão do fenômeno de ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de "tampa" ("lid"). Quando o substrato liga-se à superfície enzimática, esta tampa se move, alterando a forma fechada da enzima para

a forma aberta, tornando o sítio ativo acessível ao substrato e, simultaneamente, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000)

Recentemente foi elucidado que a presença de uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Algumas lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica não mostram ativação interfacial, embora apresentem uma "tampa" anfifílica cobrindo seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual de lipase é a seguinte: uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002).

O mecanismo de catálise por lipases está ilustrado na Figura 1. A reação de hidrólise do substrato ocorre da seguinte maneira: o oxigênio da serina induz o ataque nucleofílico à carbonila da ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelas ligações de hidrogênio com átomos de nitrogênio de resíduos aminoácidos da cadeia principal pertencente à cavidade oxianônica. Na etapa seguinte, o álcool é liberado e um complexo acil-enzimático é criado. Um ataque nucleofílico (água na hidrólise, ou álcool na transesterificação) produz novamente um intermediário tetraédrico. Na última etapa o intermediário tetraédrico formado é hidrolisado liberando o produto e a enzima, que é recuperada para um próximo ciclo catalítico (RAZA; FRANSSON; HULT, 2001).

O arranjo especial destes três grupos de aminoácidos diminui o valor do pKa do grupo hidroxila da serina, facilitando a formação do alcóxido, que promove o ataque catalítico à carbonila do substrato, formando o intermediário tetraédrico acil-enzima. Esses intermediários sofrem ataque nucleofílico, regenerando a enzima e formando o produto final da catálise enzimática, como ácido, ésteres ou amidas (RAZA; FRANSSON; HULT, 2001).



**Figura 1:** Mecanismo de reação da lipase catalisando hidrólise ou esterificação  
**Fonte:** RAZA; FRANSSON; HULT, 2001.

Além de catalisar reações envolvendo a hidrólise de óleos e gorduras, as lipases têm sido utilizadas em reações envolvendo substratos não-naturais. Em solventes orgânicos, as lipases catalisam a transferência de compostos acila de grupos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores (álcoois, aminas, ácidos carboxílicos). Dependendo do tipo do doador de acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos (FABER, 2004).

Existem inúmeras vantagens do uso de enzimas em solventes orgânicos ou soluções aquosas contendo solventes orgânicos em comparação com a água, como o aumento da solubilidade de substratos apolares, a mudança de termodinâmica do equilíbrio em favor de

síntese sobre a hidrólise, e a eliminação de contaminação microbiana nas misturas de reação (OGINO; ISHIKAWA, 2001; FERNANDEZ et al, 2006).

Dentre as reações catalisadas por lipases em meio orgânico, é possível destacar a esterificação de glicosídeos de origem natural que possuem atividade farmacológica, tais como flavonoides glicosilados, glicosídeos terpênicos (como gimsenosídeos e glicosídeos cardiotônicos), derivados de ramnopiranosil, alcalóides da colchicina, (como colchicoside e tiocolchicoside) dentre outros (RIVA, 2002).

Em escala industrial, onde são desejados muitos ciclos de processos com alto rendimento, as propriedades enzimáticas geralmente precisam ser melhoradas. Em alguns casos as enzimas solúveis precisam ser imobilizadas para serem reutilizadas por longos períodos em reatores industriais. As enzimas imobilizadas com produtos químicos compatíveis e técnicas adequadas de bioengenharia, podem apresentar propriedades funcionais melhores, como melhoria na enantiosseletividade e na estabilidade (MATEO et al, 2007).

O uso de enzimas imobilizadas permite uma fácil remoção e recuperação da enzima após a reação, facilitando sua reutilização e pode melhorar sua solubilidade (ELLIAH et al, 2004). A imobilização aumenta a estabilidade térmica da enzima e parece melhorar sua atividade de síntese em meio com solvente orgânico (SILVA; CONTESINI; CARVALHO, 2008). Assim, a utilização de enzimas imobilizadas em reações tem sido bastante vantajosa, embora tenha um custo maior, em razão do alto valor agregado dos produtos.

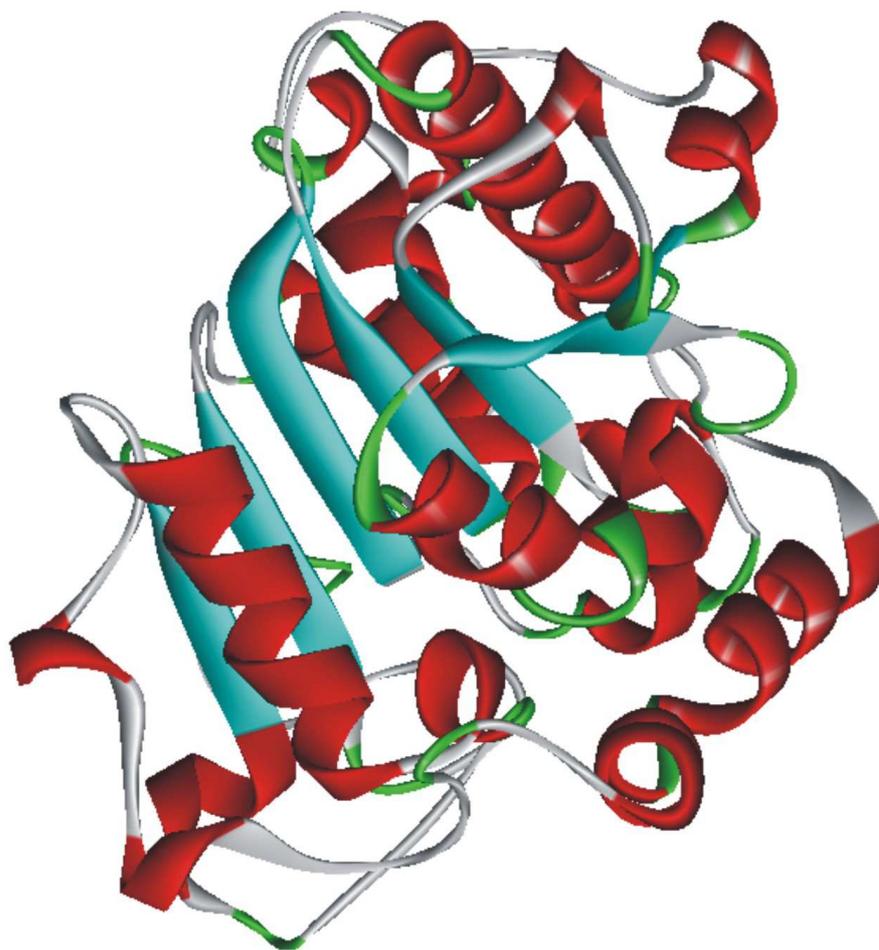
### **2.1.1 Lipase B de *Candida antarctica***

A lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) é um dos biocatalisadores mais utilizados em síntese orgânica tanto em laboratório como em escala industrial, devido à sua capacidade de aceitar vários substratos, tolerância média a meios não aquosos e resistência à desativação térmica. A CAL B pertence à superfamília de  $\alpha/\beta$  hidrolases, possui 317 resíduos de aminoácidos e uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico e histidina (Ser-Asp-His) (LUTZ, 2004).

O resíduo nucleofílico serina é localizado no C-terminal da fita  $\beta 5$  de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal " $\beta$  em torno de  $\alpha$ ", designada como a cavidade nucleofílica. O sítio é composto de uma folha  $\beta$  central consistindo de 8 diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta 1 - \beta 8$ ) conectadas com seis a hélices (A - F). A estrutura

cristalográfica de lipase B de *Candida antarctica*, mostra uma grande variação de conformação no ambiente de seu sítio ativo, o que pode explicar a grande variação na especificidade de substratos destas enzimas (UPPENBERG et al, 1995). A figura 2 mostra a estrutura tridimensional da CAL B.

A estrutura parece estar em uma conformação "aberta" com uma entrada bastante restrita ao sítio ativo. Isso explicaria a especificidade de substrato e o alto grau de estereoespecificidade da CAL B (UPPENBERG et al, 1994).



**Figura 2:** Estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica* (E.C.3.1.1.3 - Triaciglicerol Hidrolase). Obtida por difração de raios-X, resolução: 2,10 Å. PDB: 1LBT.  
**Fonte:** UPPENBERG et al, 1994.

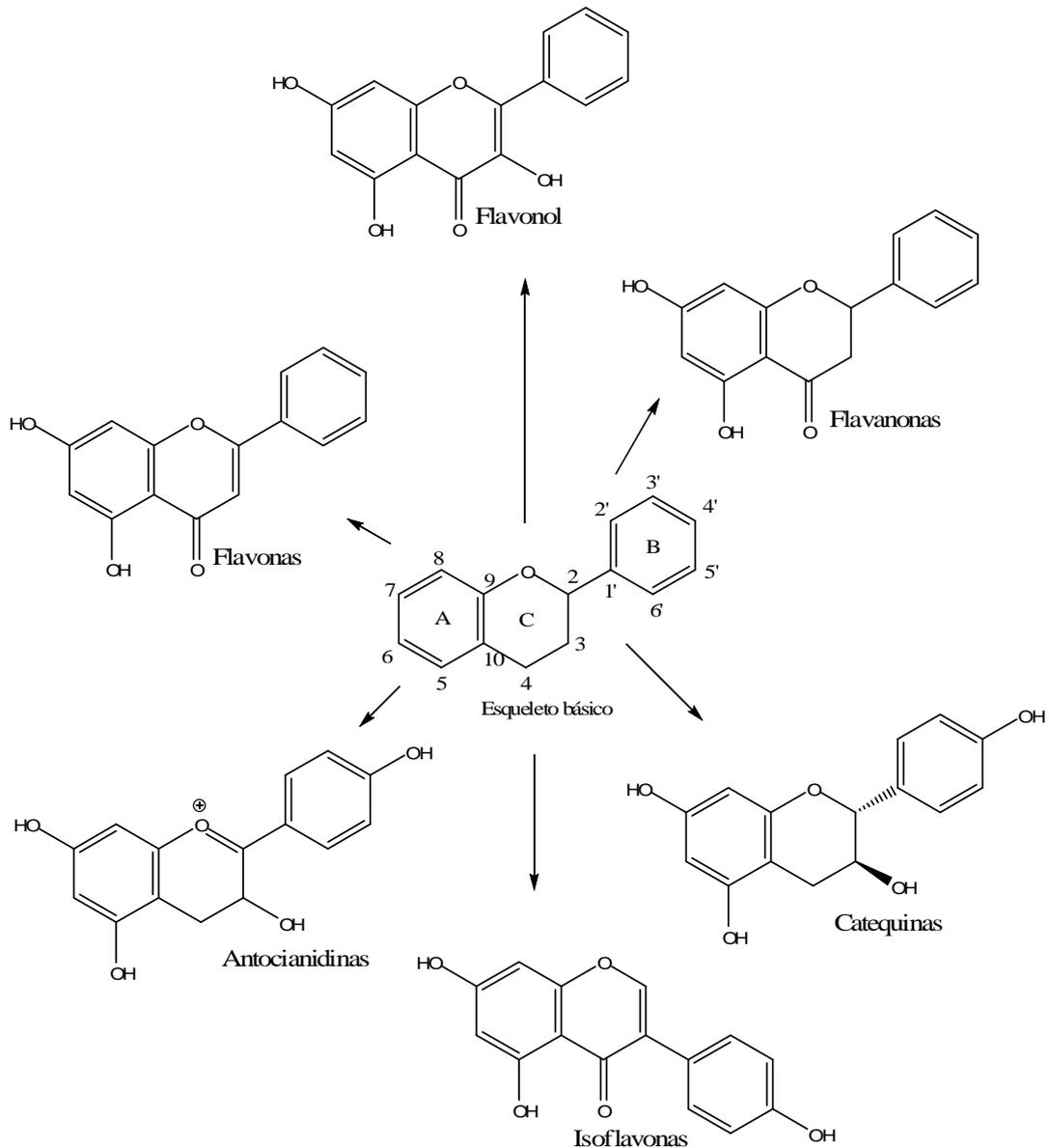
## 2.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides compõem uma classe de metabólitos vegetais secundários amplamente encontrados nas plantas. São compostos polifenólicos formados por um núcleo básico arranjados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Os átomos de carbono nos anéis A e C são numerados de 2 a 10, e o anel B de 1' a 6' (figura 3). São produzidos por via biossintética mista: a via chiquimato e a via acetato. A via chiquimato origina o anel B e os três átomos de carbono que formam o anel C (núcleo C3-C6), enquanto a via acetato dá origem ao anel A (DEWICK, 2002).

Reações enzimáticas de oxidação, redução e alquilação produzem variações sobre o esqueleto básico dos flavonoides dando origem às diferentes classes destes compostos, como por exemplo, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas e catequinas (DEWICK, 2002). O núcleo flavonoide e suas diferentes classes estão representados na figura 3.

Nas angiospermas, os complexos formados entre antocianinas e flavonas são responsáveis pela pigmentação azulada das pétalas de flores, cuja coloração atrai insetos polinizadores. Já os flavonoides presentes na parte externa das folhas, atuam na proteção contra os raios UV-B. Além disso, muitos flavonoides protegem as plantas contra microorganismos patogênicos, insetos e até mesmo contra animais herbívoros (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

Na dieta humana, flavonoides podem ser naturalmente encontrados em frutas, verduras, legumes, e em bebidas como cerveja, vinho, chá verde e chá preto. O consumo de flavonoides é recomendado por sua ação antioxidante e na prevenção de doenças cardiovasculares. Podem ser ingeridos na forma de suplementos nutricionais, juntamente com certas vitaminas e minerais (HOLLMAN; KATAN, 1999; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).



**Figura 3:** Esqueleto básico de flavonoide e suas diferentes classes.

**Fonte:** DEWICK, 2002 (adaptado).

Diversos estudos com ensaios biológicos revelam que os flavonoides possuem atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, antioxidante, hepatoprotetora, antihipertensiva, hipolipidêmica, anti-inflamatória e antiplaquetária, dentre outras. Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham em vários sistemas enzimáticos, incluindo hidrolases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases. Seus efeitos cardioprotetores resultam da capacidade de inibir a peroxidação lipídica, quelar metais redox ativos e atenuar outros processos

envolvendo espécies de oxigênio reativas (DI CARLO et al, 1999; HARBONE; WILLIAMS, 2000; NIJVELDT et al, 2001; CUSHNIE; LAMB, 2005).

Os flavonoides estão presentes em quase todas as partes das plantas, desde as raízes até flores e frutos, ocorrem de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos). A atividade biológica dos flavonoides e de seus metabólitos depende de sua estrutura química, que varia de acordo com os substituintes, incluindo hidrogenação em C2 e C3, hidroxilações, C- ou O-metilações, sulfatações e glicosilações. Dentre as substituições glicídicas destacam-se glicose, ramnose, galactose e arabinose. Desta forma, os flavonoides no reino vegetal podem ocorrer na forma de ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda, como uma mistura deles (HAVSTEEN, 2002).

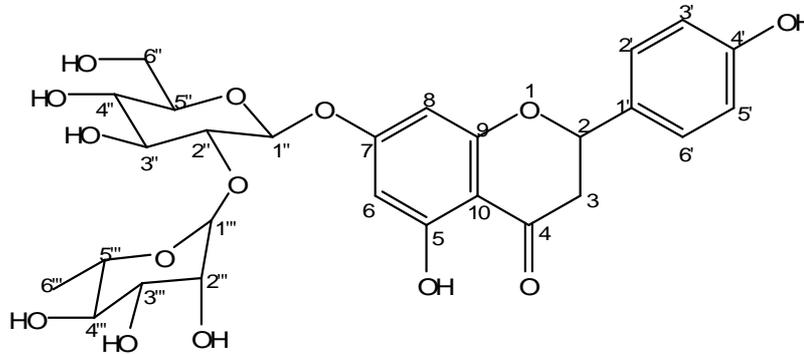
Os flavonoides retiram espécies de oxigênio reativo especialmente em forma de ânions superóxido, radicais hidroxila, peróxidos lipídicos ou hidroperóxidos. Desta maneira bloqueiam a ação deletéria destas substâncias sobre as células. Os critérios químicos para estabelecer a capacidade antioxidante dos flavonoides são: presença de estrutura de O-dihidroxi no anel B, o que dá maior estabilidade à forma radicalar e participa da deslocalização de elétrons; ligação dupla, em conjunto com C=O na posição 4 do anel C e com os grupos de -OH nas posições 3 (anel C) e 5 (anel A), juntamente com a C=O da posição 4 no anel A, são necessários para o pleno potencial antioxidante (MARTÍNEZ-FLÓREZ, et al, 2002).

### 2.2.1 Naringina

A naringina é uma flavanona de ocorrência natural, principalmente em frutas cítricas. É extraída da casca de *Citrus paradisi* (laranja vermelha) e *C. aurantium* (laranja amarga), podendo também ser encontrada na polpa de seus frutos, sementes, folhas e flores. Utilizada industrialmente em perfumaria, bebidas, como edulcorante, estabilizante de óleos vegetais e em produtos de panificação, permanece sendo estudada por conta de suas propriedades antioxidantes (GIANNUZZO et al, 2000; PETERSON et al, 2006).

Na medicina chinesa é tradicionalmente utilizada como anti-inflamatório e antioxidante (FANG et al, 2006). Além destas, foram associadas à naringina propriedades antimicrobiana (HAN; YOU, 1988), antiviral (KAUL; MIDDLETON; OGRA, 1985), antiulcerosa (MARTIN et al, 1994), anticarcinogênica (SO et al, 1997) e hipolipidêmico (BOK et al, 2010). A naringina parece atuar ainda, na proteção de células da musculatura lisa vascular,

reduzindo os efeitos aterogênicos, por aumentar a força e a resistência dos vasos sanguíneos (KIM et al, 2003). Sua estrutura química pode ser visualizada na figura 4.



**Figura 4:** Naringina (7, 5, 4'-trihidroxi flavanona-7-ramnoglicosídeo)

### 2.3 BIOCATALÍSE DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS EM SOLVENTE ORGÂNICO UTILIZANDO CAL B

Devido às suas propriedades biológicas, vem surgindo um grande interesse, por parte da indústria cosmética e farmacêutica em aplicar extratos vegetais contendo flavonoides em sua composição. Entretanto, a utilização de flavonoides glicosilados na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos, em alguns casos, é limitada por sua baixa estabilidade e solubilidade em bases lipofílicas. Para melhorar suas propriedades, vários estudos vêm sendo realizados, com a finalidade de modificar a estrutura química destes compostos através de reações químicas e enzimáticas. A reação de acilação das hidroxilas situadas na porção glicosídica da molécula tem recebido interesse particular por ser capaz de tornar estes compostos mais solúveis em meio lipofílico, sem perda de atividade biológica (CHEBIL et al, 2006).

Os flavonoides glicosilados, devido à presença do açúcar em sua estrutura química, normalmente são pouco solúveis em soluções lipofílicas. Os glicosídeos são ainda, suscetíveis à hidrólise em soluções ácidas ou em presença de enzimas (ARCT; PYTROWSSKA, 2008).

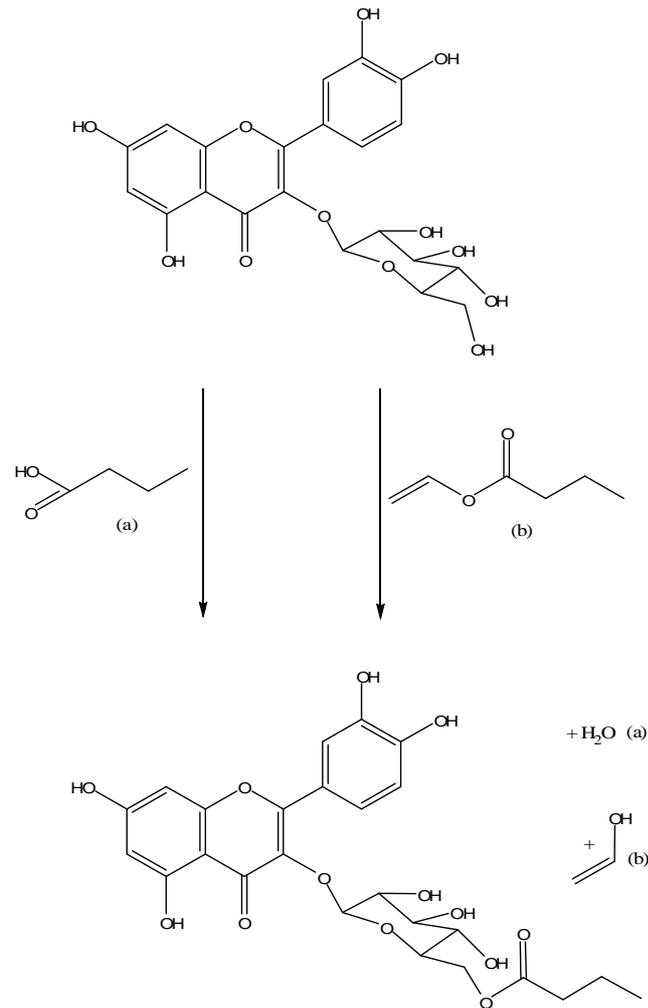
A obtenção de derivados acilados de flavonoides glicosídeos via esterificação das hidroxilas glicosídicas com moléculas alifáticas pode ser usada como uma ferramenta para adequar sua solubilidade em sistemas de bases oleosas e emulsões, aumentando sua eficácia em estabilizantes gordurosos, formulações lipofílicas e oleosas, característica interessante para as preparações farmacêuticas e cosméticas. O uso de métodos químicos de acilação convencional das hidroxilas presentes nos flavonoides pode levar a uma mistura de produtos com diferentes graus de esterificação, uma vez que estes métodos demonstram pouca regioseletividade (BOHM, 1998; PATTI; PIATELLI; NICOLSI, 2000).

Para contornar as desvantagens do processo químico convencional, o uso de enzimas em meio não-aquoso tem aberto novos caminhos para a obtenção de produtos com alto valor agregado derivados de antioxidantes naturais. A utilização de enzimas permite que a acilação ocorra apenas na porção glicosídea da molécula, preservando o núcleo flavonoide de alterações (MELLOU et al, 2005).

A reação de acilação de flavonoides glicosídeos pode ser realizada com diferentes tipos de enzimas tais como a subtilisina (protease de *Bacillus subtilis*), lipases de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacea*, lipoproteínas, carboxilesterases e até mesmo extratos celulares, entretanto a lipase B de *Candida antarctica* em sua forma imobilizada parece ser a mais versátil e regioseletiva enzima para esta reação (CHEBIL et al, 2006). A acilação enzimática regioseletiva de flavonoides também foi realizada com sucesso, empregando cultura de células de *Ipomoea batatas* (NAKAJIMA et al, 2000).

Geralmente, as enzimas utilizadas na acilação enzimática de flavonoides estão na forma imobilizada, porque a imobilização facilita a recuperação do produto final e facilita o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima. Além disso, a imobilização parece aumentar a resistência da enzima à inativação por diferentes agentes desnaturantes (PLOU et al, 2002).

Na acilação enzimática de flavonoides duas reações são possíveis: a esterificação direta e a transesterificação, ambas as reações estão ilustradas na figura 5.



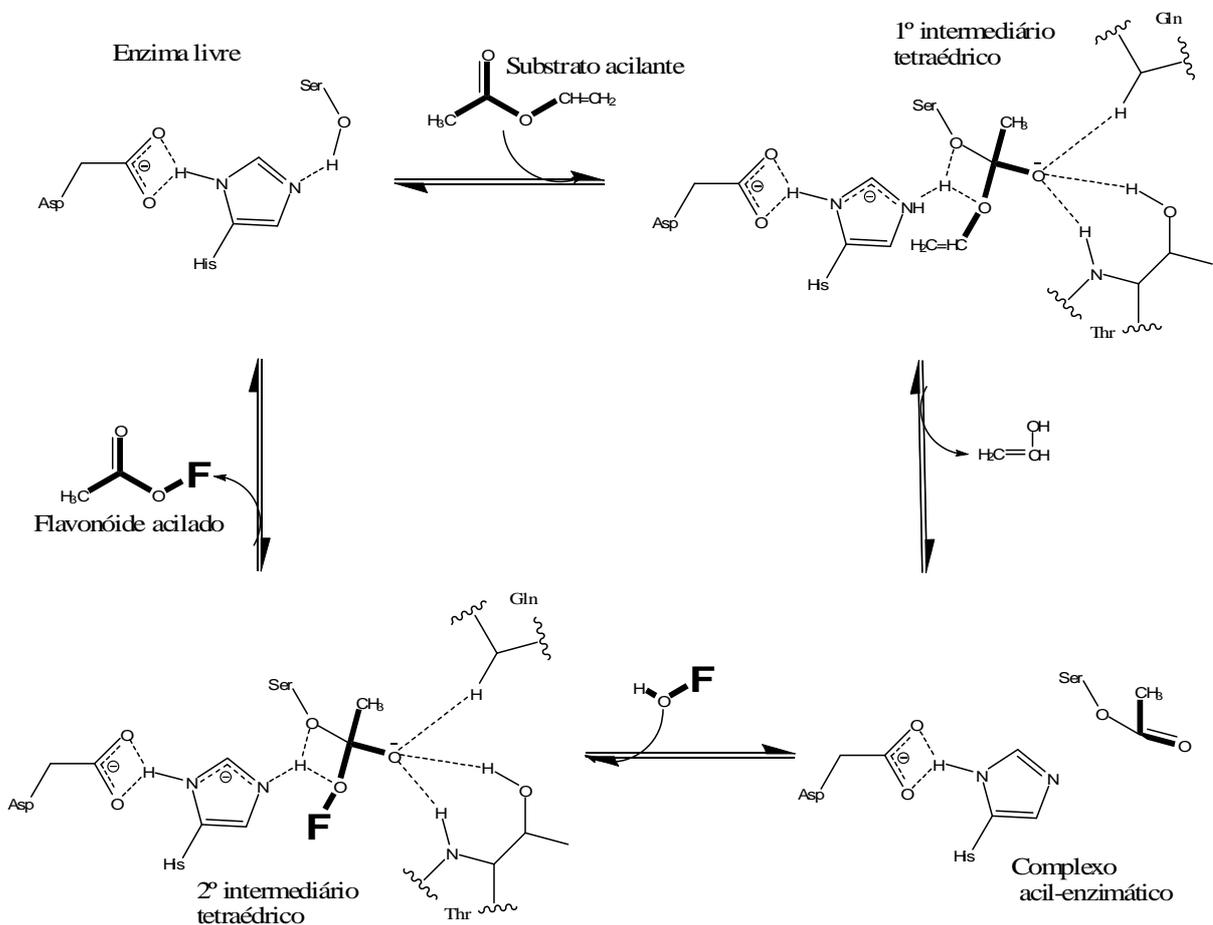
**Figura 5:** Representação esquemática da acilação enzimática: (a) esterificação; (b) transesterificação.

**Fonte:** CHEBIL et al, 2006.

Uma investigação, através de estudos de modelagem molecular analisou o comportamento regioseletivo da CAL B para dois flavonoides glicosídeos: rutina e isoquercitrina. Os resultados mostraram que a porção aglicona destes flavonoides se encaixam na entrada da cavidade de ligação, estabilizadas por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Já a porção açúcar dos flavonoides fica posicionada perto do fundo da cavidade catalítica, onde é estabilizada no local dos resíduos catalíticos, em uma pequena região polar no fundo da cavidade. Apesar do caráter aromático do substrato, não é possível interação devido à falta de resíduos aromáticos no sítio catalítico. Outras análises dos complexos mostraram que as posições 3''-OH e 4'''-OH da rutina e a posição 6''-OH de isoquercitrina (tabela 1, pág. 33), ambas localizadas na extremidade da parte glicosídica dos substratos,

foram os únicos grupos hidroxila que satisfizeram os critérios de proximidade com os resíduos catalíticos (OLIVEIRA et al, 2009).

Esta regiosseletividade estrita, sugerida pela modelagem molecular, estão em conformidade com os dados experimentais de publicações anteriores para estes mesmos flavonoides (rutina e isoquercitrina) (RIVA et al, 1996; NAKAJIMA et al, 1999), e fornecem uma explicação adequada, sob o ponto de vista molecular, da regiosseletividade da CAL B na acilação de flavonoides glicosídeos (OLIVEIRA et al, 2009). O mecanismo geral de acilação de flavonoides utilizando lipase B de *C. antarctica* proposto por Oliveira et al (2009), encontra-se na figura 6.



**Figura 6:** Mecanismo de reação da acilação de flavonoide (F) catalisada por CAL B, evidenciando os dois intermediários tetraédricos e o complexo acil-enzimático.

**Fonte:** OLIVEIRA et al, 2009.

### 2.3.1 Condições operacionais que influenciam a biocatálise de flavonoides em solvente orgânico

A escolha do solvente é uma etapa importante nas reações de biocatálise envolvendo lipase e substratos não convencionais. As primeiras reações de acilação enzimática de flavonoides utilizaram piridina como solvente, embora este meio forneça um alto rendimento de reação, seu uso tem sido evitado por conta de sua elevada toxicidade (DANIELLI, 1997). A toxicidade precisa ser levada em consideração principalmente se o produto reacional tiver fins cosméticos, farmacêuticos ou alimentícios, sendo desejável empregar solventes menos tóxicos (CHEBIL et al, 2006).

O solvente a ser utilizado em biocatálise precisa ser compatível com a enzima para que ela permaneça ativa e não seja desnaturada. Não há consenso claro ainda sobre a escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações enzimáticas, mas o mais frequentemente usado é o logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P$ ). Além da lipofilicidade, propriedades como polarizabilidade, solubilidade e constante dielétrica dos diferentes solventes, também podem ser levados em consideração para investigar a influência do solvente em biocatálise, dentre outras (LAANE et al, 1987; VALIVETY et al, 1991; LORTIE, 1997).

Alterações na rigidez da enzima podem ser ocasionadas por ação recíproca entre as propriedades dielétricas do solvente e as interações polares e iônicas da enzima. O efeito do solvente pode ser ocasionado pela variação de energia livre total associada com a energia de solvatação dos diferentes solventes. Deste modo, o solvente contribui para a estabilização das cargas no estado de transição através de modificações da polaridade do sítio ativo (GUPTA, 1992; KRISHNA, 2002).

Estudos utilizando simulações de dinâmica molecular para investigar a estrutura e flexibilidade da lipase B de *Candida antarctica* em água e em diferentes solventes, mostraram que a estrutura da enzima possui alta estabilidade em solventes orgânicos. Já a flexibilidade da enzima depende da constante dielétrica do solvente. A flexibilidade é alta em meio aquoso e diminui em solventes orgânicos. Com a diminuição da constante dielétrica, a quantidade de água ligada à superfície enzimática diminui significativamente. Esta redução da flexibilidade da CAL B em solventes apolares, não ocorre somente por causa da interação entre as moléculas do solvente com a proteína, mas também por interações da água ligada à enzima e suas trocas na superfície enzimática (TRODLER; PLEISS, 2008).

Em meio a solventes orgânicos as lipases, por serem enzimas hidrolíticas, necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A quantidade de água presente é fundamental para a estabilidade térmica, contribuindo para a integridade estrutural e ainda influencia na polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína (LORTIE, 1996).

Além de influenciar na flexibilidade da enzima, o solvente precisa ser compatível com os substratos. A combinação de moléculas com polaridades distintas é a maior dificuldade a ser superada em reações onde os substratos apresentam considerável diferença em termos de polaridade, como um carboidrato e um ácido graxo, por exemplo. Nestes casos, solventes com baixa polaridade ( $\log P > 3$ ), como o n-heptano e n-hexano, não são adequados porque a solubilidade do açúcar seria muito baixa. Um bom contato entre dois substratos tão diferentes pode ser obtido utilizando solventes que solubilize ambos os substratos ao menos parcialmente. Portanto, é preciso escolher um meio com polaridade intermediária ( $\log P$  entre 2 e 3). Os alcoóis terciários são especialmente bons candidatos, pois não interagem com o sítio ativo do catalisador porque não são substratos para a maioria das lipases, não têm efeito de desativar a enzima e são facilmente removidos da reação (VILLENEUVE, 2007).

O efeito do solvente na atividade da lipase B de *C. antarctica* (CAL B) tem sido investigado por diversos autores. Estudos comparando a reação de acilação enzimática em diferentes solventes obtiveram melhores resultados em presença de acetona ou misturas entre acetonitrila e piridina (RIVA et al, 1996; DANIELI, et al, 1997; NAKAJIMA et al, 1999; GAO et al, 2001; KONTOGIANI et al, 2003; OTTO et al, 2003; MELLOU et al, 2005).

A influência do solvente orgânico na atividade da CAL B na reação de acetilação do ciclohexanol com o acetato de vinila foi investigada, testando vários solventes e suas misturas. Para esta reação, associações entre piridina e tetrahidrofurano (THF), dioxano e acetonitrila puros, forneceram melhores resultados na biocatálise, entretanto estes solventes não são convenientes a reações envolvendo flavonoides para uso biológico, devido à sua alta toxicidade (DANIELLI et al, 1997). A influência da acetona, 2-metil,2-butanol, THF e acetonitrila na acilação enzimática da rutina e naringina com diferentes ácidos graxos foi investigada. A acetona, acetonitrila e 2-metil-2-propanol forneceram as maiores taxas de conversão, enquanto o THF pareceu ser incompatível com a enzima nesta reação (KONTOGIANNI et al, 2003; MELLOU et al, 2006).

A contradição observada para o THF em ambos os estudos pode ser explicada pela diferença entre os substratos. No caso específico da acilação enzimática de flavonoides glicosídicos, os solventes mais adequados para a este tipo de reação são alcoóis terciários

como o 2-metil-2-propanol (álcool terc-butílico) e o 2-metil-2-butanol (álcool terc-amílico), e a acetona (CHEBIL et al, 2006). Eles são bastante empregados nestas reações porque permitem a solubilização de substratos com polaridades distintas e por apresentarem toxicidade menor em relação a outros solventes orgânicos empregados em biocatálise (VILLENEUVE, 2007).

Os líquidos iônicos podem se apresentar como uma alternativa aos solventes orgânicos em reações de biocatálise. Estes solventes têm conquistado espaço por serem menos tóxicos, com potencial aplicação em preparações cosméticas, produtos farmacêuticos e em alimentos. Devido a estas vantagens, vários ésteres de flavonoides têm sido preparados em líquidos iônicos (KATSOURA et al, 2006; LUE; GUO; XU, 2010).

Outra opção ao uso de solventes orgânicos para a realização de reações de biocatálise de flavonoides seria desenvolver a reação na ausência de solvente, liquefazendo os substratos por meio de aquecimento. Neste caso, o próprio agente acilante solubiliza o flavonoide e a enzima para que ocorra a formação de ésteres. Experimentos de esterificação de polifenóis de origem natural, empregando ácido cinâmico, cinamato de metila, benzoato de metila e salicilato de metila como solvente e CAL B imobilizada como catalisador, indicaram a esterificação de 100% dos substratos alcoólicos (GUYOT et al, 1997; ENAUD et al, 2004).

Entretanto, de acordo Kontogiani et al (2001), quando ácidos graxos são utilizados como agente acilante e solvente na biocatálise, a taxa de esterificação da naringina e rutina, foi menor em comparação à reação com solvente orgânico. Apesar de ser uma alternativa interessante, a biocatálise em meio livre de solvente possui o inconveniente de necessitar de processos mais rigorosos para eliminar o excesso de agente acilante e recuperar o produto sintetizado (CHEBIL et al, 2006).

Além do solvente, a água é um dos componentes de maior importância na biocatálise em meio orgânico por possuir um papel importante na flexibilidade enzimática. Entretanto, seu excesso pode favorecer a reação de hidrólise e não a de esterificação. Sendo o nucleófilo na reação de hidrólise, a água pode atuar como um inibidor competitivo, nas reações de síntese catalisadas por lipases em solventes orgânicos. (LORTIE, 1996).

Para favorecer a síntese, a atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) deve ser mantida tão baixa quanto possível, pois o teor de água na enzima é mais importante para manter a atividade catalítica do que a quantidade total contida no sistema reacional (HALLING, 1994). Assim, pequenas variações na quantidade de água do meio levam a uma grande variação na atividade de água da enzima, e é por isso que a CAL B é tão sensível à quantidade de água no meio reacional (CHAMOULEAU et al, 2001).

Apesar de necessária ao desenvolvimento da biocatálise, a atividade de água geralmente não afeta significativamente a enantiosseletividade da CAL B. A enantiosseletividade das lipases parece ser aumentada à medida que a temperatura aumenta e em meio a solventes mais lipofílicos (WEHTJE; COSTES; ADLERCREUTZ, 1997; PERSSON et al, 2002).

A água também surge no meio reacional como produto da esterificação. Para controlar sua presença no meio, muitos autores tem sugerido o uso de peneiras moleculares de 3 ou 4Å durante a reação de biocatálise. Estas peneiras são inertes quimicamente e adsorvem a água produzida no desenvolvimento da reação. As peneiras também são utilizadas para retirar água contida no solvente (GAYOT et al, 2003; KONTOGIANNI et al, 2003; ARDHAOUI et al, 2004a, 2004b; PASSICOS; SANTARELLI; COULON, 2004; MELLOU et al, 2005, 2006; STEVENSON et al, 2006; YOUN et al, 2007). Outra sugestão para minimizar a quantidade de água do meio, consiste na desidratação dos substratos (flavonoide e agente acilante), pois este procedimento aumentou cerca de 10 a 15% o rendimento da reação (GAYOT et al, 2003; MELLOU et al, 2005).

O efeito da temperatura nas reações de biocatálise de flavonoides é um fator importante nas reações enzimáticas porque influencia na viscosidade do meio, na solubilidade dos substratos e produtos, na atividade enzimática e até mesmo na desnaturação do biocatalisador (ARROYO et al, 1999).

A escolha da temperatura depende da enzima e do solvente utilizados. Geralmente, a temperatura escolhida para as reações de acilação de flavonoides empregando CAL B imobilizada é de 45 a 60 °C, o que permite a reutilização da enzima (KONTOGIANNI et al, 2003; PASSICOS; SANTARELLI; COULON, 2004).

A cinética da biocatálise melhora significativamente com o aumento da temperatura do meio de reação. Enaud et al (2004), observou que a flordizina, uma di-hidrochalcona glicosilada, foi totalmente convertida em cinamato de flordizina após 15, 4 e 2 horas de reação a 60, 80 e 100 °C, respectivamente. Este resultado mostra que o aumento de temperatura diminui o tempo de reação, entretanto, diminui gradativamente a atividade enzimática. Neste mesmo estudo, foi constatada a perda de atividade enzimática da CAL B em 30%, após 24 horas de reação a 80 °C.

A maioria das reações de biocatálise de flavonoides tem utilizado fontes de aquecimento convencionais. Entretanto, o uso de energia de micro-ondas como auxiliar em reações químicas tem sido objeto de interesse em diversos estudos.

O mecanismo de aquecimento por micro-ondas é diferente do aquecimento convencional. O método convencional de aquecimento ocorre através da transferência de calor, que pode se dar pelos mecanismos de condução, convecção e irradiação. Já o aquecimento por micro-ondas ocorre pela transformação de energia eletromagnética em calor. O mecanismo ocorre pela absorção dirigida de energia por grupos funcionais que levam condutividade iônica, em que o calor é gerado através de perdas por fricção. Ou ainda pela rotação de dipolo, quando um campo elétrico é aplicado provocando o alinhamento das moléculas ao cessar o campo elétrico, a energia absorvida é então liberada para a solução circundante (BOGDAL, 2005).

Essa absorção de energia faz com que os grupos funcionais envolvidos tenham uma maior reatividade com reagentes em relação aos que são simplesmente incubados à mesma temperatura. No entanto, em muitos sistemas o mecanismo para isso ocorra não está bem elucidado. Os resultados da irradiação de micro-ondas exibem maiores taxas de reação em relação ao aquecimento convencional, provavelmente porque o solvente empregado na reação é ativado pela absorção de energia de micro-ondas, enquanto os substratos das reações não o são (LIN; LIN, 1998).

As primeiras reações utilizando a energia de micro-ondas como fonte aquecedora empregavam forno doméstico, entretanto, uma série de dificuldades técnicas decorrentes da adaptação deste equipamento, estimulou o desenvolvimento de reatores de micro-ondas específicos para síntese orgânica. Os reatores para uso em laboratório operam de modo diferente do forno doméstico, neste último a distribuição de micro-ondas não é homogênea, enquanto nos reatores a distribuição é homogênea e pode ser focalizada. Além disso, os reatores para uso em laboratório possibilitam o controle da potência e temperatura (evitando assim a decomposição térmica da amostra), da pressão e a utilização de refluxo ou resfriamento simultâneo. Assim, estes reatores são mais vantajosos por serem mais eficientes do ponto de vista energético, por apresentarem maior segurança e por garantir uma maior reprodutibilidade de experimentos se comparados aos fornos de uso doméstico (STRAUSS; TRAINOR, 1995).

Em reações com lipase a energia de micro-ondas oferece várias vantagens, pois não prejudica a enzima em relação às propriedades de estabilidade e especificidade de substrato; há um acréscimo no rendimento das reações de 7 a 12 vezes; além das habituais reações de hidrólise, é possível executar reações de síntese em presença de solventes compatíveis com micro-ondas. Por isso, as micro-ondas vêm despertando grande interesse por ser uma ferramenta potencial para acelerar as reações de biocatálise (BRADDOO et al, 2002).

Yadav e Lathi (2004) demonstraram a excelente atividade enzimática na presença de irradiação de micro-ondas com a reação de transesterificação entre acetoacetato de metila e diferentes alcoóis. Apurou-se que a conversão global, bem como taxa de reação foi maior sob irradiação de micro-ondas em relação ao aquecimento convencional. Paralelamente, foi realizado experimento de controle, na ausência de enzima, que não apresentou qualquer reação de conversão. Os resultados sugerem que o efeito da irradiação de micro-ondas não é puramente térmico. Parece haver um sinergismo entre a catálise enzimática e irradiação de micro-ondas. Os autores investigaram três tipos de lipases: Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435, e concluíram que esta última apresentou maior atividade em micro-ondas.

## 2.4 SUBSTRATOS EMPREGADOS NA BIOCATÁLISE DE FLAVONOIDES COM LIPASE

### 2.4.1 Características do flavonoide

A lipase B de *Candida antarctica* atua somente na porção glicosídica dos flavonoides, por isso não apresenta reação frente à aglicona. De fato, em reações comparando o desempenho da CAL B frente a diferentes flavonoides, esta enzima não apresentou reatividade frente a quercetina (ARDHAOUI et al, 2004a; CHEBIL et al, 2007), naringenina, hesperetina e crisina (CHEBIL et al, 2007).

Dentre os flavonoides glicosilados, a CAL B parece exibir preferência pelos flavonoides monossacarídeos, por exibirem menor impedimento estérico junto à enzima, em relação aos dissacarídeos. Entretanto, esta preferência não pode ser generalizada porque a ausência de grupos hidroxila primários, e baixa solubilidade destes substratos, também podem influenciar nestes resultados (GAO et al, 2001). A concentração de flavonoide no meio reacional parece não interferir na taxa conversão da reação, mas a solubilidade do flavonoide é um passo limitante na reação enzimática (ENAUD et al, 2004; KONTOGIANNI et al, 2003).

Assim, comparando a acilação dos flavonoides esculina, rutina e hesperidina, a esculina forneceu melhores resultados por ser monossacarídeo e possuir hidroxila primária. A

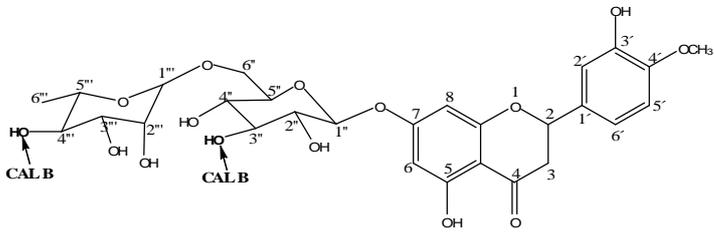
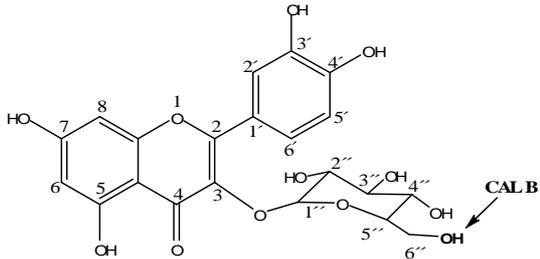
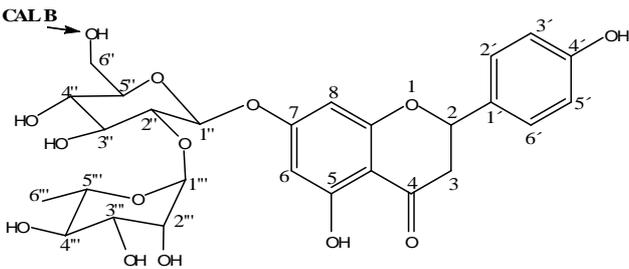
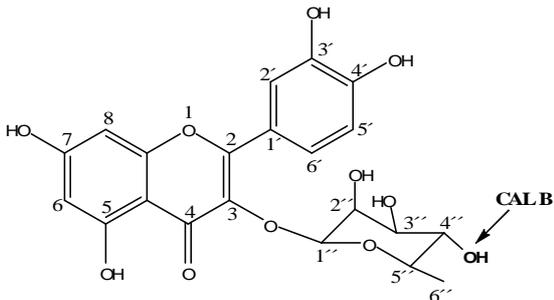
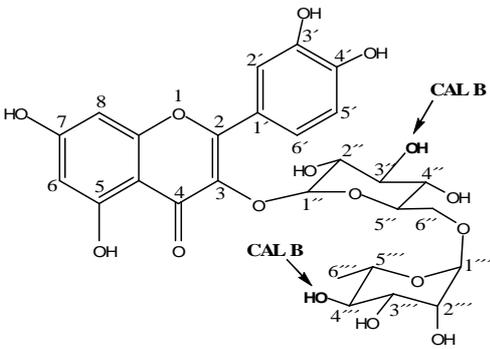
rutina e a hesperidina, apesar de possuírem a mesma porção glicosídica, o dissacarídeo glicose-ramnose ligado ao núcleo flavonoide, forneceram taxas de conversão diferentes, com menor rendimento para a hesperidina, provavelmente devido à sua baixa solubilidade em 2-metil-2-butanol (ARDHAOUI et al, 2004a).

A estereoquímica das ligações glicosídicas desempenha um papel importante na acilação enzimática por CAL B. Esta enzima possui maior facilidade em esterificar os grupos hidroxila primários, porque estes possuem menor impedimento estérico (DANIELLI et al, 1997; NAKAJIMA et al, 1999). Assim, flavonoides que possuem a molécula de glicose compondo sua estrutura, com a posição C6''-OH livre são esterificados nesta posição, como por exemplo a naringina e a isoquercitrina (DANIELLI et al, 1997; OTTO et al, 2003; MELLOU et al, 2005, 2006). Contudo, em moléculas que não possuem hidroxilas primárias, como no caso da rutina, a posição C3''-OH da glicose e C4''-OH da ramnose podem ser aciladas (DANIELI; RIVA, 1994; ISHIHARA et al, 2002; XIAO et al, 2005).

A maior parte das reações de biocatálise de flavonoides com CAL B produz monoésteres. Entretanto, Danielli et al (1997), observou a formação de ésteres de rutina acilados nas posições C3''-OH e C4'''-OH, assim como a esterificação da isoquercitrina, nas posições C3''-OH e C6''-OH, em acetona/piridina (9:1, v/v). Fenômeno semelhante foi relatado por Chebil et al (2007) para a isoquercitrina, em que foi observada a esterificação nas posições C2''-OH, C3''-OH e C6''-OH em acetona, acetonitrila ou 2-metil,2-butanol. Em ambos os estudos, o agente acilante empregado foi o acetato de vinila.

A posição de acilação da CAL B em alguns flavonoides glicosilados pode ser vista na tabela 1.

**Tabela 1:** Posição de acilação por CAL B em flavonoides glicosilados.

Flavonoide	Posição da acilação	Referência(s)
Hesperidina		ARDHAOUI et al, 2004a.
Isoquercitrina		OLIVEIRA et al., 2009; NAKAJIMA et al, 1999; RIVA et al, 1996; DANIELI, et al, 1997; GAO et al, 2001; CHEBIL et al, 2007; SALEM et al, 2010.
Naringina		GAO et al, 2001; GAYOT et al, 2003; KONTOGIANNI et al, 2003; OTTO et al, 2003; PASSICOS et al, 2004; MELLOU et al, 2005, 2006.
Quercitrina		DANIELI, et al, 1997.
Rutina		DANIELI, et al, 1997; KONTOGIANNI et al, 2003; ARDHAOUI et al, 2004a, 2004b; PASSICOS et al, 2004; XIAO et al, 2005; OLIVEIRA et al., 2009; LUE et al, 2010; VISKUPICOVA et al, 2010.

## 2.4.2 Características do agente acilante

A estrutura e concentração do agente acilante influenciam no desempenho da acilação enzimática de flavonoides, pois o mesmo precisa ser compatível com a lipase, mas sem interferir na atividade biológica dos ésteres formados. Assim, diversos tipos de agentes acilantes têm sido testados neste tipo de reação, como ácidos graxos saturados, insaturados, substituídos, dicarboxílicos, ácidos aromáticos e ésteres. A proporção de agente acilante/flavonoide influencia na reação de esterificação, porque o excesso de agente acilante desloca o equilíbrio da reação em direção à síntese (PATTI; PIATTELLI; NICOLOSI, 2000).

Na biocatálise de flavonoides glicosilados com CAL B, as maiores taxas de conversão geralmente são obtidas quando são utilizados ácidos graxos ou seus derivados na forma de ésteres vinílicos (MELLOU et al, 2005). Esta preferência por ésteres vinílicos deve-se à estabilização destes compostos por tautomerização durante a reação, desfavorecendo a reação inversa, ou seja, a hidrólise (YANG; HENKE; BORNSCHEUER, 1999).

A especificidade da lipase B de *Candida antarctica* para ácidos graxos de cadeia linear tem sido investigada em diversos estudos, entretanto, parece controverso. Para a maioria dos autores, o rendimento da reação depende do comprimento do agente acilante utilizado.

A esterificação da rutina e da naringina por ácidos graxos saturados (C8, C10 e C12), catalisada pela CAL B em diferentes sistemas solventes, foi investigada por Kontogianni et al. (2003). Os resultados deste estudo demonstraram que parece não haver relação entre o comprimento da cadeia do doador de acila com rendimento de conversão. Entretanto, diferenças significativas podem não ter sido observadas neste estudo, devido à pequena diferença de tamanho entre os ácidos graxos estudados.

Reações comparando a acilação da rutina com diferentes ácidos graxos também saturados (C6 a C18), mostraram que para comprimentos de cadeia entre C6 e C12, o desempenho da reação aumentou com o comprimento de ácidos graxos de cadeia, mas os ácidos láurico (C12), palmítico (C16) e esteárico (C18) mostraram maior rendimento para a reação (ARDHAOUI et al, 2004a). Este resultado se repetiu, quando além de ácidos graxos saturados, foram testados também ácidos dicarboxílicos e ácidos graxos substituídos. Em geral, os ácidos graxos apresentaram melhores taxas de conversão em relação aos ácidos graxos substituídos (ARDHAOUI et al, 2004b).

Paralelamente, o estudo de acilação de isoquercitrina com ésteres vinílicos derivados de ácidos graxos de cadeia variável (C4 a C18), mostraram que o rendimento da reação caiu

de 66% para o butanoato de etila, para 38% quando o estearato de etila foi usado como agente acilante (SALEM et al, 2010). Katsoura et al. (2006), relataram semelhante tendência durante a acilação de naringina e rutina com CAL B lipase utilizando ácidos graxos livres e ésteres vinílicos, em líquido iônico. Neste estudo, o maior rendimento de conversão, em torno de 65%, foi observado para agentes acilantes de cadeia curta.

O efeito do número de carbonos da cadeia de ácidos graxos (C4 a C18) na formação de ésteres de rutina também foi investigado por Viskupicova et al (2010). A maior taxa de conversão (> 50%) foi alcançada quando ácidos graxos de cadeia curta e média (C4 a C12). Com o aumento no tamanho da cadeia (de C12 até C18), o rendimento da esterificação diminuiu gradualmente.

Este comportamento seletivo para os ácidos graxos de cadeia curta e média pode ser atribuído à estrutura do sítio acil-ligante da CAL B. A estrutura do bolso acil-ligante da lipase possui forma elíptica afunilada, uma estreita fenda de 9,5 x 4,5 Å. À medida que cresce número de carbonos do doador de acila (a partir de C13), começa a haver um certo impedimento estérico, resultando em baixa eficiência da reação enzimática (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998).

Conforme mencionado anteriormente, a esterificação da rutina com acetato de vinila produz ésteres acilados nas posições C3''-OH e C4''-OH (DANIELLI et al, 1997). Entretanto, em reações em que foram empregados ácidos graxos (KONTOGIANNI et al, 2003) ou mesmo o cinamato de vinila (ISHIHARA et al, 2002) na reação, houve a formação de um único composto acilado em C3''-OH. Esta diferença de resultados indica que o aumento no tamanho da cadeia do agente acilante, pode melhorar a regioseletividade da CAL B (KONTOGIANNI et al, 2003).

Reações comparando ácidos graxos saturados e insaturados indicam melhor rendimento para os ácidos graxos saturados (ARDHAOUI et al, 2004a; MELLOU et al, 2006; VISKUPICOVA et al, 2010). Talvez por isso, as reações empregando os ácidos graxos insaturados sejam escassas e pouco investigadas. Quando tratam-se de reações envolvendo ácidos graxos hidróxi-insaturados ou provenientes de óleos vegetais, existe ainda menos informação.

Nas reações de acilação de flavonoides com os ácidos orgânicos aromáticos, o melhor desempenho na reação, depende dos substituintes, da posição das hidroxilas no anel (orto, meta ou para) e do comprimento da cadeia lateral (NAKAJIMA et al, 2000; GAO et al, 2001; OTTO et al, 2003; ENAUD et al, 2004; STEVENSON et al, 2006).

#### 2.4.2.1 Óleo de mamona como agente acilante

A história da mamona (*Ricinus communis*) é antiga, já que seu óleo era utilizado pelos egípcios há 4.000 anos, na iluminação e na produção de unguentos. No Brasil, a planta foi trazida pelos colonizadores portugueses com a fim de empregar seu óleo na iluminação e lubrificação de eixos de carroça. O clima tropical facilitou seu cultivo, a ponto de hoje a mamona ser encontrada de norte a sul no país (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010).

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de óleo de mamona, ficando atrás apenas da Índia e China, responsáveis por aproximadamente 90% da produção mundial. O estado da Bahia concentra boa parte da produção nacional (NEGRET, 2008).

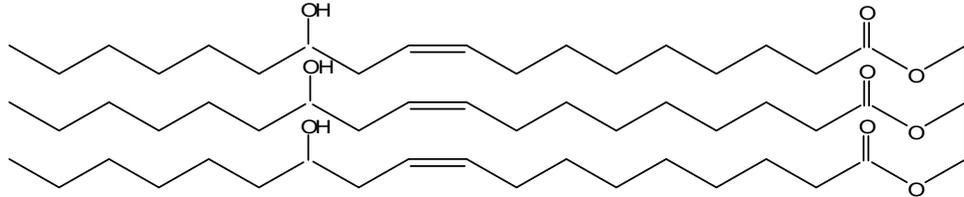
O cultivo de mamona foi impulsionado pela política de incentivo à produção de combustíveis oriundos de fontes naturais, como o biodiesel (ANTHONISEN, 2007). O óleo de mamona e os derivados da ricinoquímica têm importância em diversos setores produtivos, entre eles têxtil, celulose e papel, tintas e vernizes, lubrificantes, plásticos (poliuretano derivado do óleo de mamona), incluindo os setores farmacêutico e cosmético. Desta forma, o óleo de mamona tem sido muito valorizado devido à sua versatilidade de uso e pode substituir os óleos comestíveis em muitas áreas de aplicação industrial, onde estes são utilizados (OGUNNIYI, 2006).

Assim, pode servir como uma excelente fonte de ácidos graxos de origem natural. Os frutos e sementes de mamona podem ser observados na figura 7.

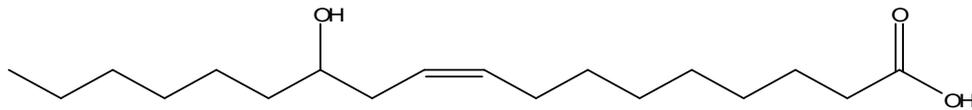


**Figura 7:** 1. Frutos da mamoneira; 2. Sementes de mamona  
**Fonte:** CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010

A mamona possui em média um teor de óleo de 45 a 50% (p/p). Na composição do óleo predomina principalmente a ricinoleína com concentração média de cerca de 90% (p/p), triglicerídeo composto pelo ácido ricinoléico (figuras 8 e 9) (FREIRE, 2001).



**Figura 8:** Ricinoleína, principal triglicerídeo do óleo de mamona



**Figura 9:** Ácido ricinoléico (ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico).

Os grupos hidroxila presentes na ricinoleína conferem, ao óleo de mamona, a propriedade exclusiva de solubilidade em álcool, enquanto sua alta viscosidade deve-se à formação de ligações de hidrogênio intermolecular dos grupos hidroxila (-OH). A presença do grupo hidroxila também confere ao óleo e aos seus derivados estabilidade extra, pois previne a formação de hidroperóxidos (FREIRE, 2001).

O ácido ricinoléico representa, a maior parte do ácido graxo presente no óleo de mamona, mas também estão presentes o ácido linoléico e o ácido oléico em menores quantidades, além de outros com percentagens menos representativas, como ácido dihidroxiesteárico, ácido licosanóico e ácido linolênico. Tanto o grupo hidroxila quanto a dupla ligação tornam o óleo apropriado a modificações químicas (CONCEIÇÃO et al. 2005). A variação do teor de ácidos graxos no óleo de mamona pode ser observada na tabela 2.

**Tabela 2:** Variação do teor de ácidos graxos no óleo de mamona

Óleo de mamona	Composição em ácidos graxos (%)
Ácido ricinoleico	84,0 - 91,0
Ácido linoleico	2,9 - 6,5
Ácido oleico	3,1 - 5,9
Ácido esteárico	1,4 - 2,1
Ácido palmítico	0,9 - 1,5

**Fonte:** MOSHKIN, 1986 *apud* CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010.

### 2.4.3 Lipofilicidade e atividade biológica dos flavonóides acil-glicosilados

Devido às suas propriedades antioxidantes e de estimulação do crescimento celular, os flavonoides são comumente utilizados em cosméticos. Por isso, a alteração na lipofilicidade dessas moléculas, sem prejudicar sua atividade biológica, é de grande interesse por possibilitar o emprego de concentrações mais elevadas e com maior potencial de absorção (ARCT; PYTROWSSKA, 2008).

A lipofilicidade, somada a outras propriedades físico-químicas de uma molécula, influencia nos processos de absorção e distribuição, pois é necessário que se difunda e atravesse as membranas biológicas que compõem os tecidos e sistemas multi-compartimentados dos seres vivos, para então atingir seu sítio de ação (SMITH; JONES; WALKER, 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002).

A absorção tópica de uma substância é limitada pela pele, que age como uma barreira efetiva de penetração seletiva. A membrana celular do estrato córneo oferece um obstáculo à entrada indiscriminada de substâncias exógenas. O principal caminho de penetração de substâncias ativas através da pele é a difusão passiva pela bicamada lipídica da via intercelular (BARRY, 2005).

A epiderme, por ser a camada externa, exerce maior controle de permeabilidade, por isso, ao propor uma formulação dermatológica, é necessário relacionar as propriedades fisiológicas e físico-químicas da pele e as características do veículo ou base penetrante. Se a substância penetrante for muito lipofílica, ela atravessa a camada córnea e encontra na derme,

uma fase aquosa pouco solúvel. A partir daí, a absorção depende da taxa de depuração da substância nesta fase aquosa.

A absorção percutânea depende de fatores como: concentração da substância aplicada na pele e área de superfície, constante de difusão através da epiderme, coeficiente de partição da substância com o veículo e a espessura do estrato córneo (BARRY, 2005).

De um modo geral, a lipofilicidade representa a afinidade de uma molécula ou um grupamento por um ambiente lipofílico. Geralmente é medida por seu comportamento de distribuição em um sistema bifásico, como o coeficiente de partição em octanol/água. Assim, quanto menos intensas as interações entre um composto apolar e a fase aquosa, maior sua lipofilicidade. Da mesma forma, quanto mais intensas as interações polares entre um composto e a fase aquosa, maior sua afinidade por esta fase, e portanto, menor sua lipofilicidade (WERMUTH et al, 1998).

É possível obter uma medida quantitativa da lipofilicidade de uma molécula, determinando a razão de suas concentrações no equilíbrio, considerando a partição desta molécula entre uma fase orgânica (octanol) e uma fase aquosa (água) (WILLIAMS; LEMKE, 2002).

Esta razão entre as concentrações é denominada coeficiente de partição (P) e é expressa por:

$$P = \frac{[A]^{fase\ orgânica}}{[A]^{fase\ aquosa}}$$

Onde:

- P é o valor do coeficiente de partição, expresso pela razão das concentrações no equilíbrio do soluto (A), particionado entre uma fase orgânica e uma fase aquosa;
- $[A]^{fase\ orgânica}$  é a concentração do soluto “A” dissolvido na fase orgânica (octanol);
- $[A]^{fase\ aquosa}$  é a concentração do soluto “A” dissolvido na fase aquosa (água).

O octanol geralmente é o solvente de escolha para a fase orgânica. No sistema octanol/água as interações polares, principalmente ligações de hidrogênio, entre o soluto e o solvente são consideradas equivalentes. Assim o valor do log P medido no sistema octanol/água, reflete principalmente as interações hidrofóbicas entre o soluto e a água. Por isso log P é considerado mais um parâmetro hidrofóbico do que lipofílico (WILLIAMS; LEMKE, 2002).

Apesar do n-octanol e a água serem os solventes de escolha padrão para medir o coeficiente de partição de um composto, eles podem ser substituídos por heptano, clorofórmio ou propilenoglicol na fase orgânica e por solução tampão fosfato (pH 7,4) na fase aquosa, utilizados como modelo para medir o coeficiente de partição no sistema biológico (DEARDEN, 1985).

A constante de equilíbrio relativa à partição de um soluto entre as fases orgânica e aquosa, denominada P, geralmente é expressa em sua forma logarítmica, como log P, e também é denominado coeficiente de partição, e apresenta valores que variam de -5 a 5 para os compostos bioativos em geral. A grandeza de log P depende das interações entre o soluto e a fase aquosa. A natureza da fase orgânica determina quais interações serão mais significativas na partição. Valores positivos do log P revelam uma maior afinidade do soluto pela fase orgânica em relação à fase aquosa, e valores negativos do log P refletem uma maior afinidade pela fase aquosa em relação à fase orgânica (TESTA et al, 2000).

O aumento da lipofilicidade de flavonoides, através de reações esterificação das hidroxilas glicosídicas, tem melhorado suas propriedades biológicas. De acordo com Mellou et al (2005), ésteres derivados flavonoides glicosilados com ácido láurico (C12), apresentaram aumento da atividade antioxidante das lipoproteínas séricas e antimicrobiana.

Ésteres derivados da rutina com grupos acilantes de cadeia média e longa também apresentaram atividade hipocolesteremiante melhoradas em relação ao composto original (LUE et al, 2010). Também foi constatado um aumento na atividade anti-angiogênica e antitumoral (MELLOU et al, 2006) e anti-inflamatória (VISKUPICOVA, 2009) de ésteres derivados da rutina com ácidos graxos insaturados (18:1; 18:2, 18:3).

Seguindo essa tendência, Salem et al (2010) comprovou que derivados lipofílicos da isoquercitrina com ácidos graxos de tamanhos variados (C4 a C18, C18:1) apresentam maior atividade antioxidante e antitumoral em relação à isoquercitrina.

Outra possível aplicação para ésteres derivados de flavonoides está na indústria alimentícia, onde podem ser empregados com função antioxidante em alimentos de base oleosa, como óleos comestíveis, manteigas, margarinas, dentre outros. Estudos com ésteres derivados da rutina com estearato, palmitato, oleato, linoleato e linolenato mostraram-se agentes eficientes na avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de girassol, além de alta capacidade antioxidante *in vitro*. Estes resultados indicam que os derivados lipofílicos de rutina podem ser agentes úteis na proteção dos alimentos à base de óleo/gordura durante a sua armazenagem ou processamento (VISKUPICOVA, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

A lipase de *C. antarctica* recombinante em *Aspergillus oryzae* imobilizada em pérolas, o flavonoide naringina (96%) e a peneira molecular (3Å) foram adquiridas da Sigma-Aldrich. O solvente utilizado foi acetona (Quimis), e o óleo de mamona, adquirido da empresa Natural Rural. Para as análises cromatográficas foram utilizados solventes grau analítico.

#### 3.2 EQUIPAMENTOS

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) foram registrados em espectrômetros JEOL<sup>®</sup> Eclipse-400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) e Bruker<sup>®</sup> DRX-500 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 400 MHz), em tubos de 5 mm, sendo as amostras solubilizadas em  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{DMSO}-d_6$  como solvente e TMS como referência interna.

A análise por cromatografia gasosa foi realizada em CG Shimadzu<sup>®</sup>, modelo GC-2010; detector por ionização em chama (FID); coluna Rtx-1 (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ) composta 100% de dimetil polissiloxano, Restek<sup>®</sup>.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em cromatógrafo líquido Merck-Hitachi<sup>®</sup> LaChrom Elite, equipado com Detector de Arranjo de Diodos (DAD). A coluna utilizada foi LiCospher 100 RP18 (5  $\mu\text{m}$ , com as dimensões 150 mm x 04 mm), Merck<sup>®</sup>.

As reações foram desenvolvidas em incubadora refrigerada com agitação “shaker”, modelo TE 424, TECNAL<sup>®</sup> e em reator de micro-ondas modelo Discover, CEM<sup>®</sup>.

### 3.3 OBTENÇÃO DO ÁCIDO RICINOLÉICO A PARTIR DO ÓLEO DE MAMONA

A obtenção do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico foi feita através de hidrólise básica. Foram adicionados 100 mL de solução concentrada de hidróxido de sódio ( $5 \text{ Mol.L}^{-1}$ ) em 300 mL de óleo de mamona para a hidrólise dos triacilgliceróis presentes no óleo, em ácidos graxos livres. Em seguida, foi adicionado ao meio solução concentrada de ácido clorídrico ( $3 \text{ Mol.L}^{-1}$ ), em quantidade suficiente para neutralizar o pH. A solução resultante foi extraída com acetato de etila por três vezes. Estas frações foram reunidas e concentradas em rotaevaporador.

Após a extração dos ácidos graxos presentes no óleo de mamona, procedeu-se à caracterização química por cromatografia gasosa. O produto foi submetido à silição utilizando o reagente bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), e três gotas de piridina como catalisador, em seguida esta solução foi aquecida por 2 minutos no micro-ondas e injetada no cromatógrafo (0,2 mL).

A análise por CG foi realizada sob as seguintes condições: temperaturas do injetor a  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e do detector a  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; temperatura da coluna programada, sendo a inicial de  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ , rampa de aquecimento de  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até a temperatura final de  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantida por 5 min. Tempo de equilíbrio do forno: 0,5 min; injeção: modo "split" 1/20. Gás de arraste: hidrogênio, vazão de 0,6 mL/min.

O ácido ricinoléico isolado a partir do óleo de mamona também foi analisado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### 3.4 ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DE NARINGINA

#### 3.4.1 Secagem dos constituintes

A secagem dos componentes da reação foi realizada segundo metodologia descrita por Gayot et al (2003). Os substratos (flavonoides e ácido graxo) foram secos em dessecador com sílica gel sob vácuo por uma semana. A sílica foi ativada previamente por secagem durante 4 h à temperatura de  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A acetona utilizada na reação passou por processo de secagem durante 7 dias com a adição de 100 g.L<sup>-1</sup> (10% p/v) de peneira molecular, previamente seca a 150°C durante 24 horas antes do uso.

### 3.4.2 Reação enzimática utilizando naringina e ácido ricinoléico ou óleo de mamona

Para cada reação foram pesados aproximadamente 0,7 g de naringina e 2,1 g de agente acilante (óleo de mamona ou ácido ricinoléico) na proporção 1/3 (p/p). Os substratos foram solubilizados em 25 mL de acetona previamente seca e aquecidos a 40 °C por 5 minutos para completa solubilização. Em seguida 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<sup>-1</sup> 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, durante 120 horas. O rendimento da bioconversão foi monitorado a cada 24 horas recolhendo-se alíquotas de 0,2 mL, sendo posteriormente analisadas por CLAE-DAD. A conversão, expressa em porcentagem (%), foi calculada através das áreas fornecidas pelo cromatógrafo, dividindo-se a área do éster pela área total, multiplicando o resultado por 100.

Um estudo comparativo, sob as mesmas condições de temperatura e concentração dos substratos, analisou o aquecimento por micro-ondas, comparando-o ao aquecimento convencional (em incubadora shaker), por um período de 12 horas. Durante este tempo, para investigar o progresso da reação foram retiradas alíquotas de 0,2 mL a cada duas horas e analisadas por CLAE-DAD.

As principais condições reacionais empregadas em micro-ondas e em incubadora shaker estão resumidas na tabela 3.

**Tabela 3:** Condições reacionais empregadas em shaker e micro-ondas

Fonte de aquecimento	Temperatura	Agente acilante	Agitação
Micro-ondas (10W)	50°C	Ácidos graxos Óleo de mamona	Magnética em nível baixo
Incubadora shaker	50°C	Ácidos graxos Óleo de mamona	80 rpm

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para confirmar a viabilidade da reação enzimática, foram realizados experimentos em condições idênticas de tempo, temperatura, concentração dos substratos, tanto em micro-ondas quanto em incubadora shaker, sem a presença da enzima. As reações em branco tiveram por objetivo investigar se a reação de síntese ocorreria sem a presença do biocatalisador, funcionando como um controle negativo para a reação. Estas reações também foram analisadas por CLAE-DAD.

### 3.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A reação foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (CLAE DAD).

Para as análises em CCD, foram utilizadas cromatofolhas de alumínio sílica gel 60A (Merck®). Para eluição, foi utilizado o sistema de solventes clorofórmio/metanol/água (8:2:0,3, v/v/v). Os produtos da reação foram visualizados com o auxílio de uma câmara cromatográfica com luz UV (254 nm) e por revelação das placas com ácido sulfúrico (10%) em metanol (revelador universal) seguido de aquecimento a 100 °C.

As alíquotas recolhidas ao longo das reações, após a filtragem, foram secas e ressuspensas em metanol, para serem analisadas por CLAE-DAD. A fase móvel utilizada foi composta por solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 % e metanol na forma de gradiente, conforme a tabela 4. A temperatura da coluna foi mantida constante a 30 °C com um fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

**Tabela 4:** Gradiente de solventes utilizados na análise por CLAE-DAD

Tempo (min)	Solvente %	
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (aq) 0,1%	MeOH
0-19	75	25
20 - 24	0	100
25 - 35	75	25

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados obtidos, foi adotada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tuckey “*post hoc*”, para efeito de comparações múltiplas entre as médias. A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software* IBM SPSS Statistics 17.0 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

Os resultados foram apresentados como razões de chance com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas significativas estatisticamente quando  $p \leq 0,05$ .

### 3.7 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, seguido de extração líquida para concentrar o produto de interesse e remover os ácidos graxos em excesso do meio. Inicialmente foi realizada extração líquida com hexano e água, seguida de uma segunda extração da fração hexano com acetonitrila. Todas as frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada.

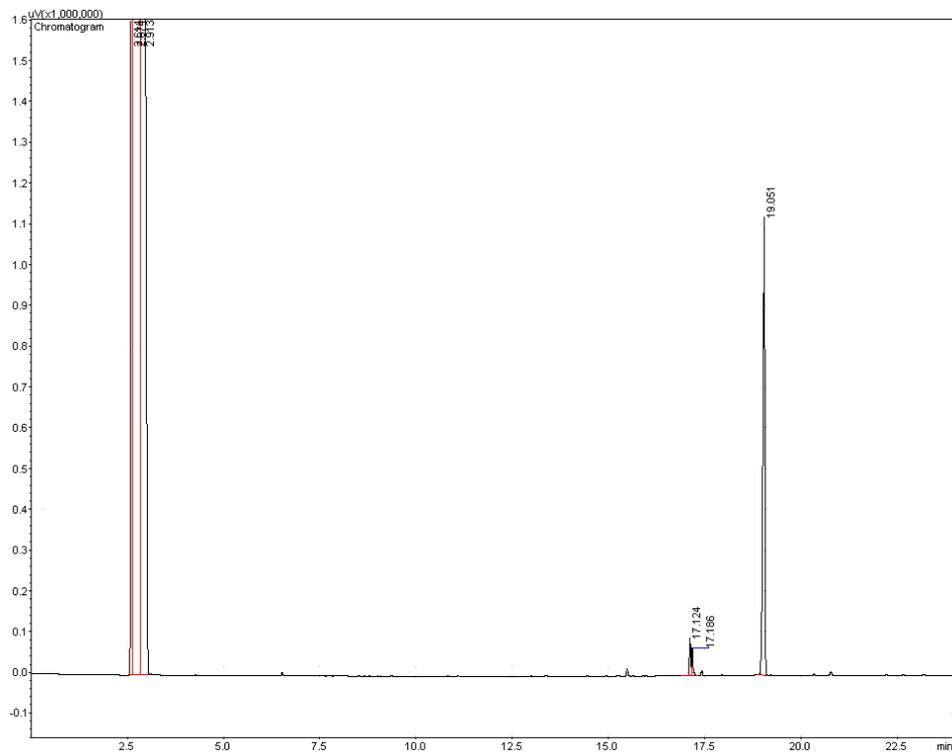
A fração da acetonitrila, contendo o produto de interesse, foi então submetida à cromatografia em coluna aberta recheada com sílica 60A (Vetec) para purificar os ésteres obtidos a partir da reação de acilação enzimática. Foram utilizados solventes hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol, combinados em ordem crescente de polaridade.

A estrutura química do produto purificado foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DO ÁCIDO RICINOLÉICO A PARTIR DO ÓLEO DE MAMONA

O produto obtido através da hidrólise do óleo de mamona foi analisado por cromatografia gasosa após reação de silanização. O cromatograma obtido pode ser observado na figura 10, a seguir.



**Figura 10:** Cromatograma do ácido ricinoléico obtido por CG após derivatização.

O cromatograma mostrou pico majoritário com tempo de retenção em 19,1 minutos. Com base nos dados encontrados na literatura pode-se atribuir este pico ao ácido ricinoléico, principal ácido graxo presente no óleo de mamona.

A estrutura química do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico, obtido do óleo de mamona, foi identificada pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  incluindo técnicas bidimensionais. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  são apresentados nas figuras 11 e 12, respectivamente.

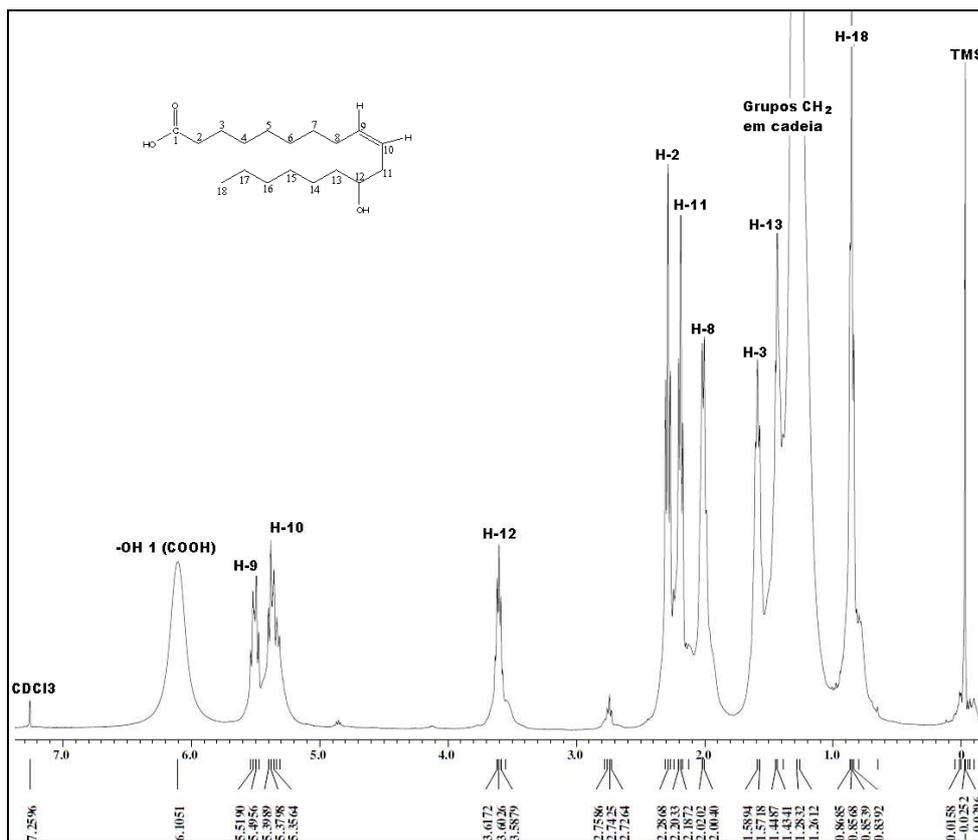


Figura 11: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico. TMS como referência interna (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

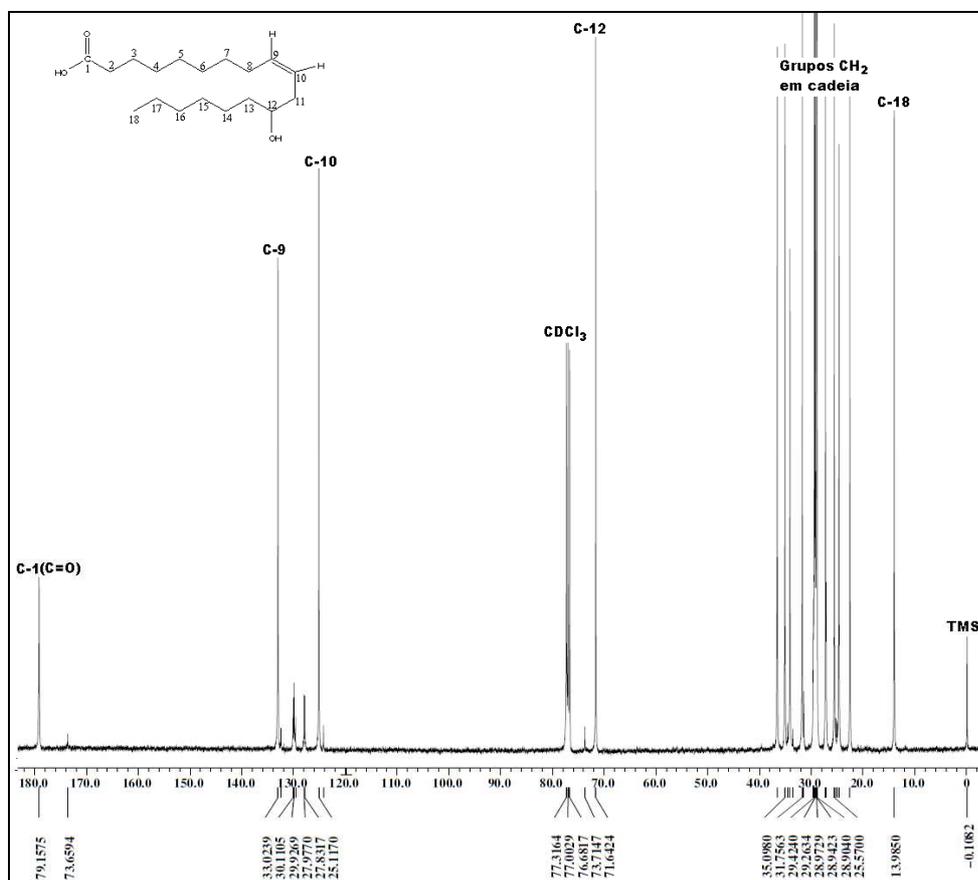


Figura 12: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico. TMS como referência interna (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou sinais característicos de ácido graxo monoinsaturado de cadeia longa. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  0,86 ppm (3H, t,  $J = 5,9$  Hz, H-18), corresponde ao grupo metila terminal. Os sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1,26-1,39 ppm sobrepostos correspondem às absorções de grupos metileno de cadeias longas. Os hidrogênios olefínicos foram detectados em  $\delta_{\text{H}}$  5,47 ppm (1H, m, H-9) e em  $\delta_{\text{H}}$  5,54 ppm (1H, m, H-10). Um sinal largo em  $\delta_{\text{H}}$  6,11 ppm de baixa intensidade, foi atribuído ao hidrogênio do grupo carboxila em troca com as moléculas do solvente.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  13,99 ppm (C-18) referente ao grupo metila terminal, entre  $\delta_{\text{C}}$  28,90-29,42 ppm referentes aos grupos metileno em cadeia, os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  133,02 ppm (C-9) e em  $\delta_{\text{C}}$  125,12 ppm (C-10) foram atribuídos aos carbonos olefínicos. Enquanto o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  179,16 ppm corresponde à carbonila.

Além da análise de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  também foram utilizadas técnicas bidimensionais, como HMQC (Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quântica espaçado por uma ligação,  $^1J_{\text{CH}}$ ) e HMBC (Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por várias ligações,  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). Os espectros bidimensionais são mostrados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

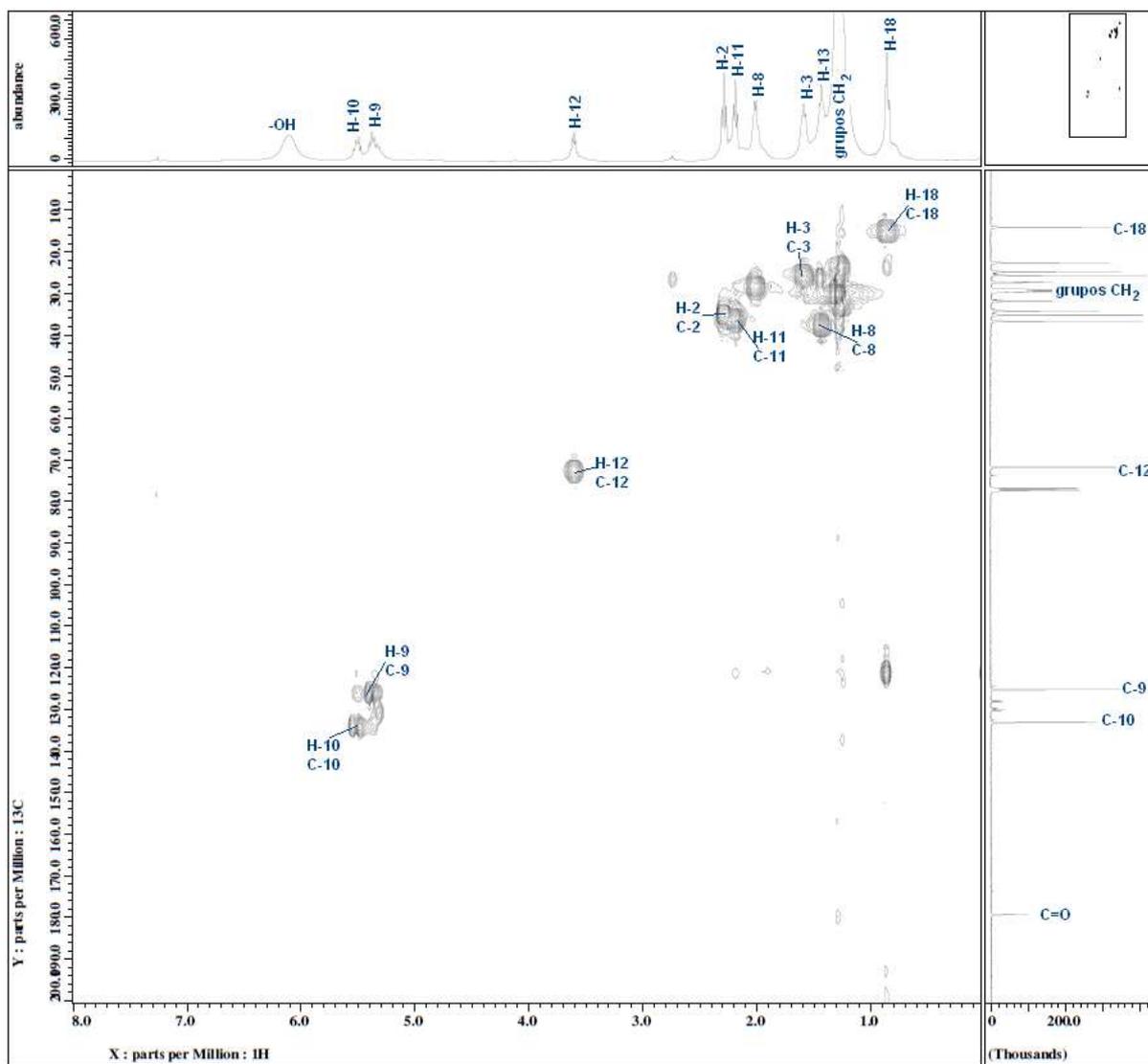
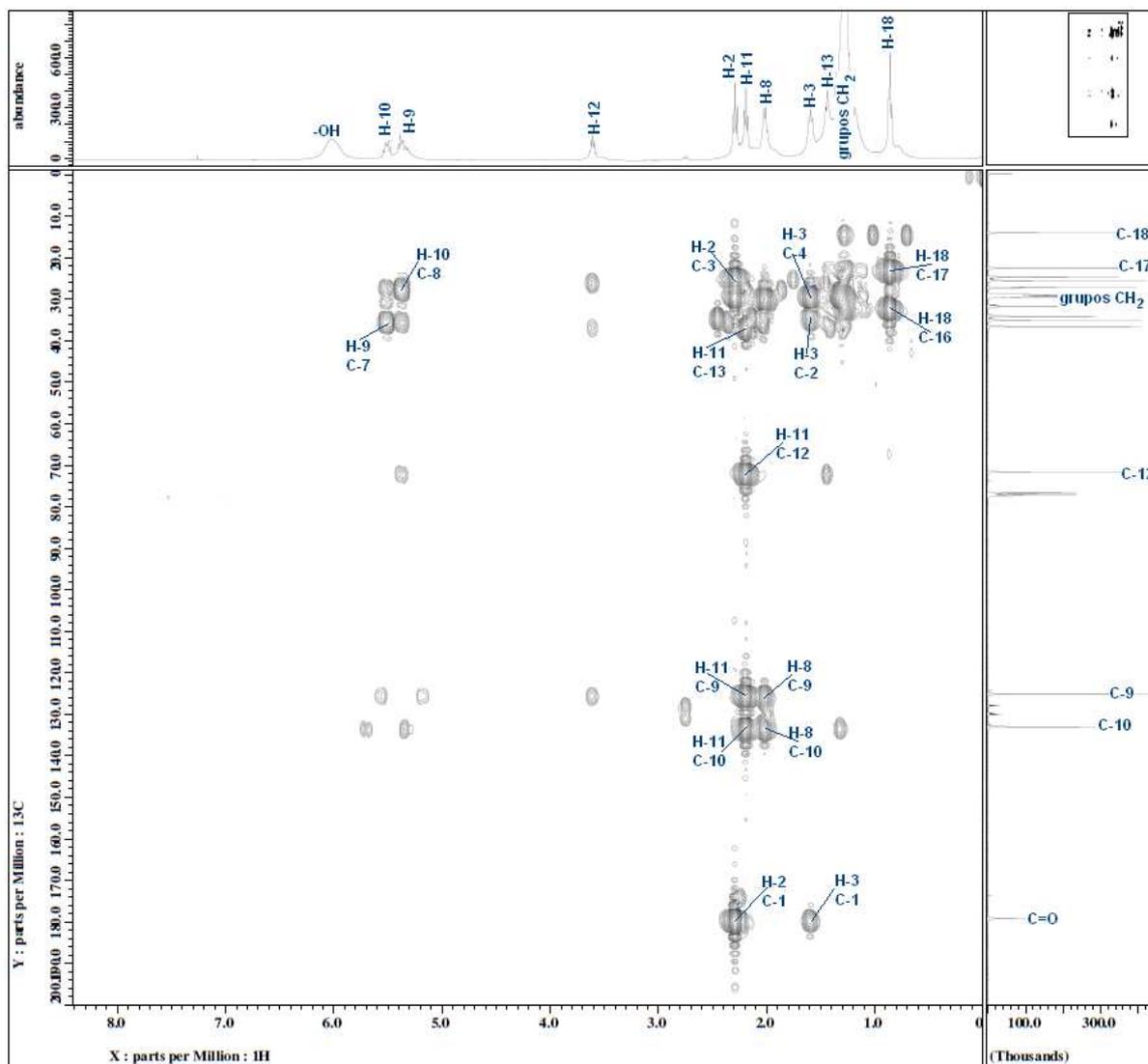
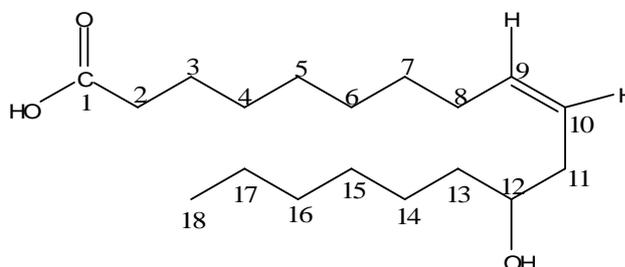


Figura 13: Espectro de HMQC do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 14:** Espectro de HMBC do ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Todos os sinais detectados foram reunidos na tabela 5. A estrutura numerada é mostrada na figura 15.



**Figura 15:** Estrutura química enumerada do ácido 12-hidrôxi-9-Z-octadecênico

**Tabela 5:** Dados de RMN para o ácido 12-hidrôxi-9-Z-octadecênico.

Posição	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	179,16	-	3H-2	2H-3
2	34,13	2,29 (t, 6.4)		
3	24,67	1,59 (m)		
4 - 7	29,42-28,90	1,26-1,39		
8	27,25	2,01 (m)	H-9	H-10
9	133,02	5,52 (m)	2H-8	2H-7; 2H-11
10	125,12	5,38 (m)	2H-11	2H-8; H-12
11	35,10	2,19 (m)	H-10	H-9
12	71,64	3,60 (m)	2H-11; 2H-13	H-10; 2H-14
13	36,60	1,43 (m)	H-12	2H-11
14	25,57	1,26-1,39		H-12
15	29,42-28,90	1,26-1,39		
16	31,76	1,26-1,39	2H-17	3H-18
17	22,54	1,26-1,39	2H-16; 3H-18	
18	13,98	0,86 (t, 5.9)	2H-17	2H-16

## 4.2 ACILAÇÃO ENZIMÁTICA DA NARINGINA E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

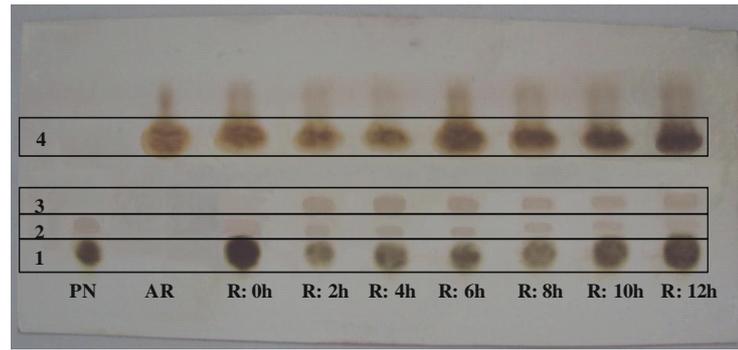
A acetona foi escolhida como solvente para esta reação, por fornecer melhor rendimento, adequada solubilização dos substratos e facilidade de purificação ao fim da reação (CHEBIL et al, 2006; MELLOU et al, 2006). As condições de tempo e temperatura, também foram escolhidas de acordo com indicação da literatura.

A razão molar entre os reagentes é outro fator que influencia no rendimento do produto da reação. Como a quantidade de éster formado é controlada pelo equilíbrio da reação, o excesso de um dos substratos aumenta o rendimento baseado no reagente limitante (SOLOMONS; FRYHLE, 2001). Na acilação de flavonoides o reagente em excesso geralmente é o agente acilante, devido ao seu custo e disponibilidade. Por isso, a proporção 1:3 (p/p) foi escolhida.

A secagem dos substratos e solventes é uma etapa muito importante para a reação de biocatálise com a CAL B. Está bem documentado na literatura que o teor de água no meio reacional, em quantidade maior que a necessária para solvatar a enzima e mantê-la ativa, diminui o rendimento da reação (GAYOT et al, 2003; KONTOGIANNI et al, 2003). Nas reações de esterificação direta com ácidos graxos livres, a presença de água no meio reacional é constante, pois esta surge como produto da esterificação. Para tentar controlar este inconveniente, são adicionadas ao meio reacional peneiras moleculares, que adsorvem a água em sua estrutura.

A adição de peneiras moleculares à reação leva a um aumento significativo em seu rendimento (GAYOT et al, 2003; MELLOU et al, 2005). As peneiras moleculares são formadas por aluminossilicatos sintéticos ou naturais, arrançados em uma macro estrutura cristalina, com canais internos de tamanho definido. As de diâmetro pequeno (3Å ou 4Å) são capazes de adsorver em sua estrutura pequenas moléculas como água, amônia e outros gases (JEWUR, 1985). A peneira molecular utilizada possui a capacidade de adsorver cerca de 15% de água em sua estrutura, de acordo com o fabricante.

As reações de acilação enzimática da naringina foram monitoradas qualitativamente através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Uma cromatografia da reação entre 0-12 horas juntamente com os substratos de partida: naringina e ácido ricinoléico, é mostrada na figura 16,.



**Figura 16:** Cromatoplaça da reação em micro-ondas, ao longo de 12 horas. Eluente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (8:2:0,3, v/v/v), revelada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em MeOH e aquecimento a  $100^\circ\text{C}$ . Em que: **1.** Naringina; **2.** Impureza presente na naringina (padrão 96%); **3.** Éster formado durante a reação; **4.** Ácido ricinoléico; **PN** - Padrão Naringina; **AR** - Ácido Ricinoléico; **R: 0h** - Reação: 0h; **R: 2h** - Reação: 2h; **R: 4h** - Reação: 4h; **R: 6h** - Reação: 6h; **R: 8h** - Reação: 8h; **R: 10h** - Reação: 10h; **R: 12h** - Reação: 12h.

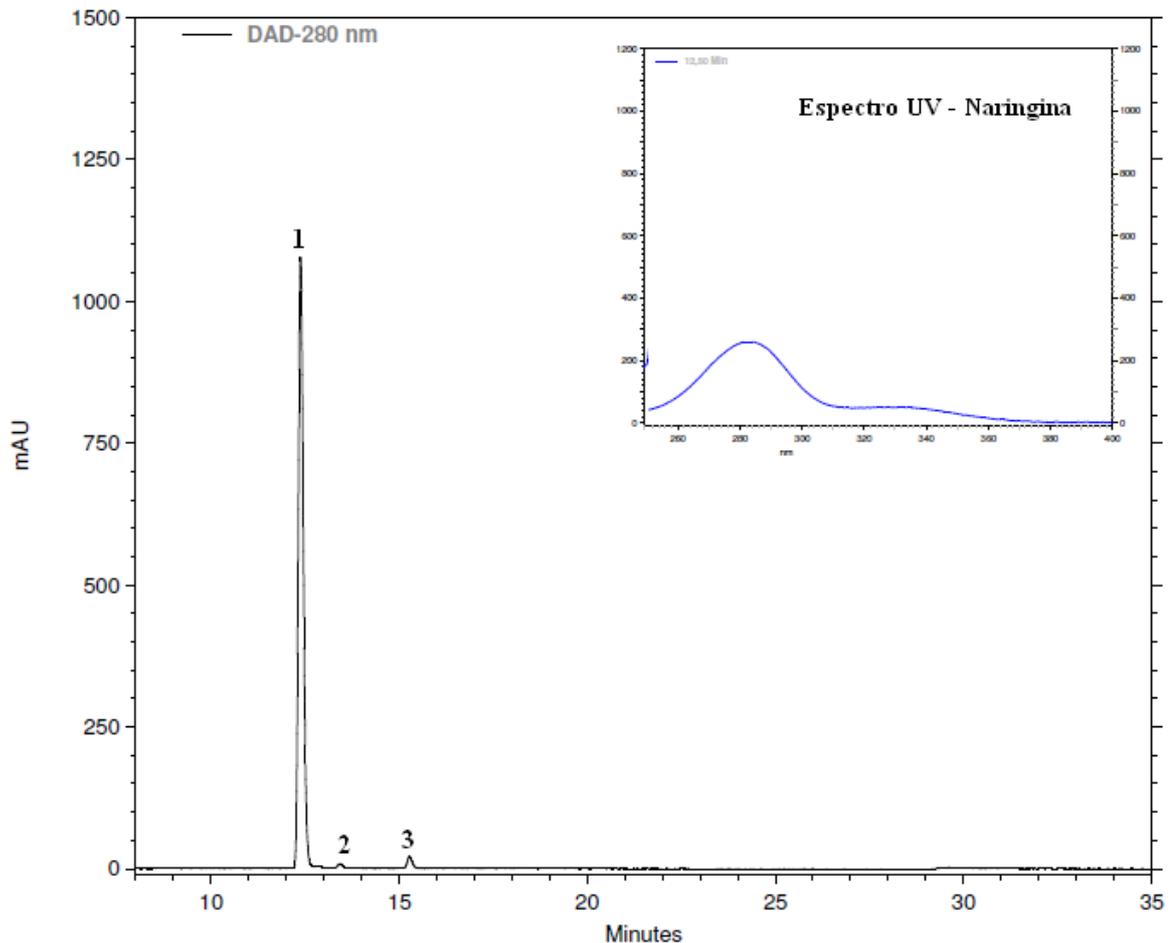
A análise da reação por CCD ao longo do tempo, indicou a formação de um produto, realçado na linha 3, com polaridade intermediária em relação à naringina (PN) e ao ácido ricinoléico (AR). Além da análise por cromatografia em camada delgada, as alíquotas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

O método de detecção mais utilizado para a investigação de flavonoides por CLAE é a espectrofotometria na faixa de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis). Não há um comprimento de onda ideal para todas as classes de flavonoides, porque eles exibem valores máximos de absorbância em comprimentos de onda distintos. O comprimento de onda mais utilizado para detecção de rotina é 280 nm. Com a introdução da tecnologia de detecção por arranjo de diodos (DAD) na década de 1980, aumentou o poder de análise de flavonoides por HPLC, pois com as informações obtidas a partir do espectro UV, é possível identificar subclasse de compostos, ou até mesmo o composto em si (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Os detectores de absorbância de radiação UV, funcionam com uma lâmpada de deutério (UV) ou tungstênio (Vis) que emite um feixe de radiação através de uma pequena célula, por onde passa a fase móvel que emerge da coluna. A radiação que não é absorvida é registrada em um dispositivo denominado fotodiodo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

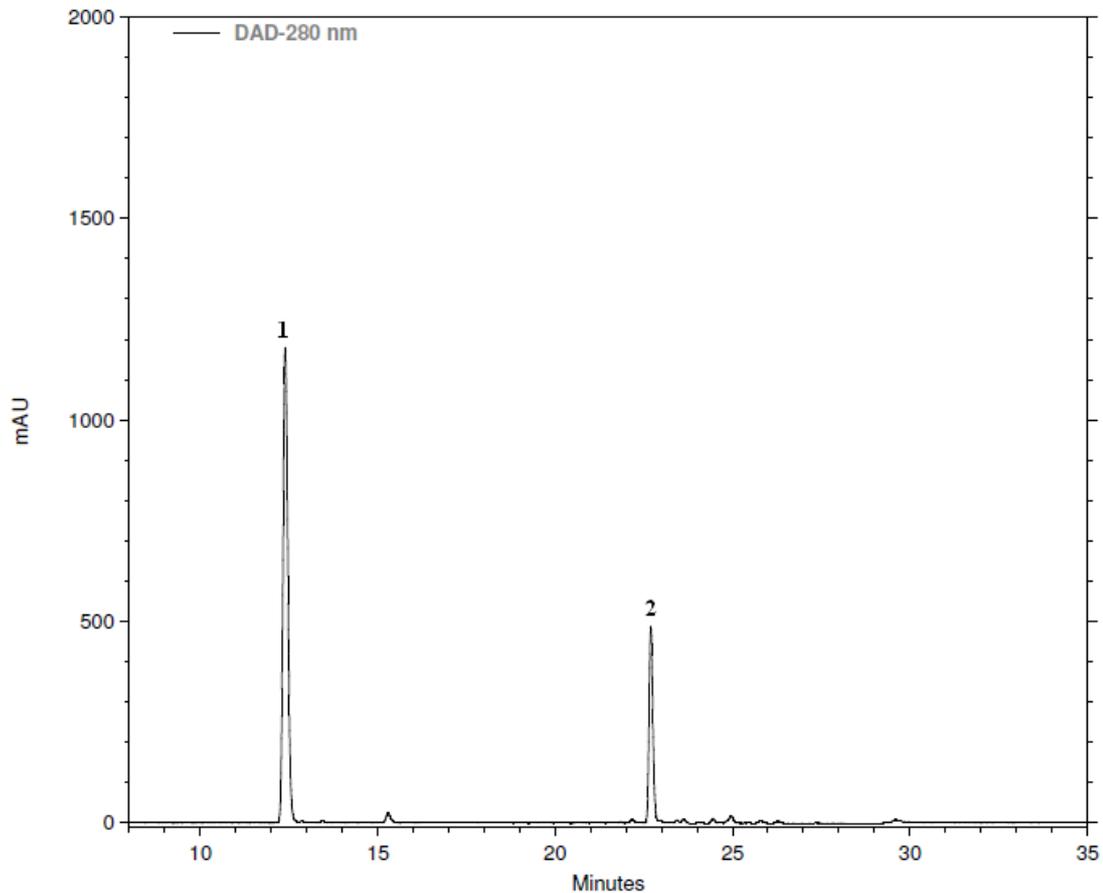
Nos detectores de arranjo de fotodiodos a radiação policromática depois de passar através da amostra é dispersa por uma grade fixa (monocromadores), alcançando então o arranjo de fotodiodos (cerca de 512 a 1024 diodos). Cada diodo mede uma banda estreita de

comprimento de onda no espectro, obtendo-se assim uma aquisição de dados paralela, em que todos os pontos do espectro são medidos simultaneamente. Esta capacidade de fazer medidas de múltiplos comprimentos de onda e a alta velocidade de aquisição dos dados, reduz o ruído dos cromatogramas e aumenta a sensibilidade do detector (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). O cromatograma padrão da naringina (96%), substância utilizada como ponto de partida na reação, é mostrado na figura 17.



**Figura 17:** Cromatograma da substância padrão naringina obtido por CLAE-DAD em metanol. (1. Naringina; 2. e 3. Impurezas presentes na substância padrão).

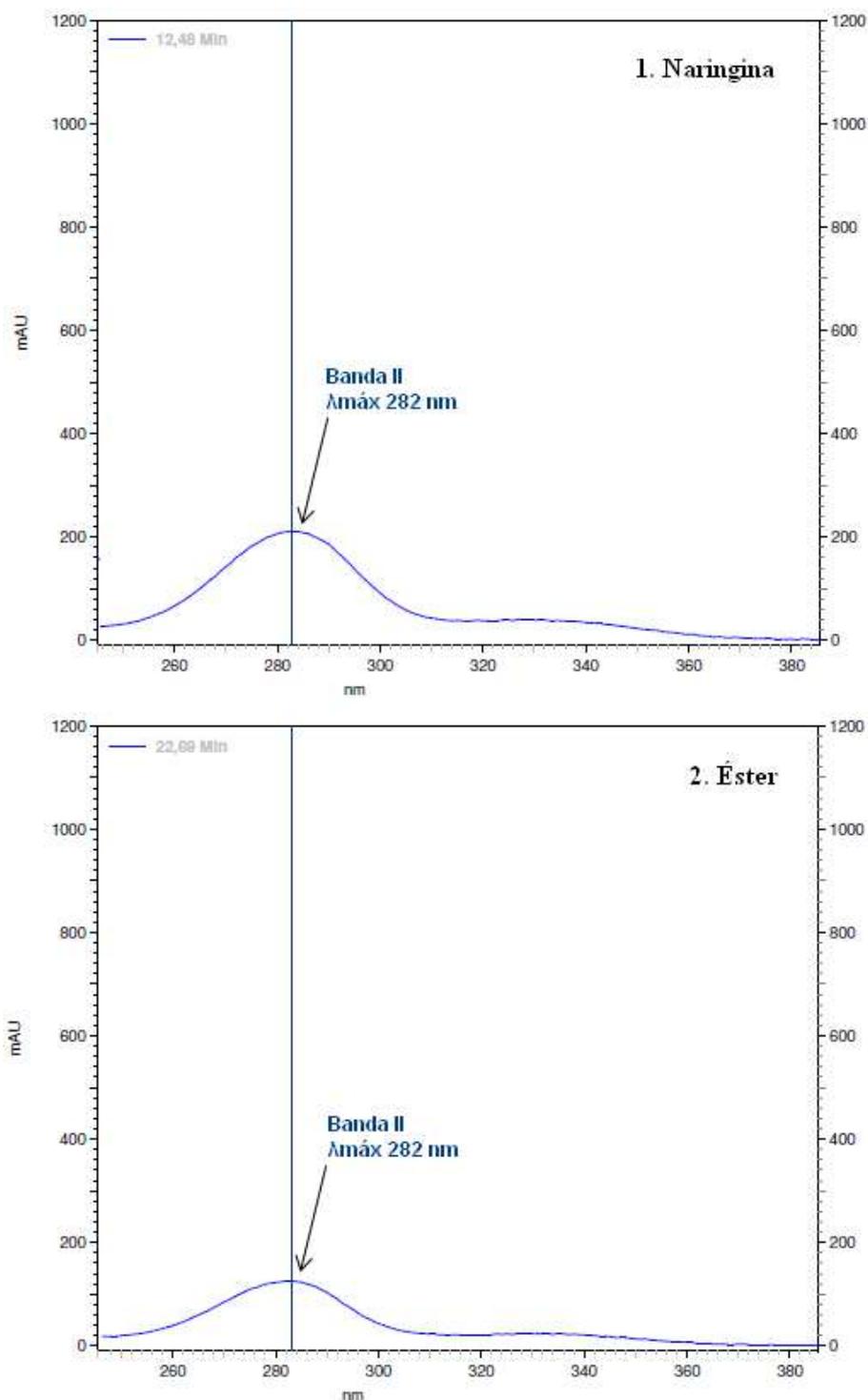
As flavanonas em geral, apresentam no espectro UV uma banda de absorção intensa entre 270-295 nm (banda II) e uma banda de menor intensidade entre 300-330 nm (banda I), devido à ausência de insaturação entre C-2 e C-3 e conseqüentemente, à ausência de conjugação entre os anéis A e B (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). A absorção máxima da naringina ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) foi observada em 282 nm.



**Figura 18:** Perfil químico da reação de acilação enzimática da naringina com ácido ricinoléico obtido por CLAE-DAD em metanol (1: naringina; 2: éster formado durante a reação).

Os cromatogramas de todas as reações foram analisados em comparação ao cromatograma padrão, permitindo-se assim, pressupor a localização de substâncias diferentes. O pico 1, mostrado na figura 18, foi identificado como naringina, por possuir tempo de retenção e espectro UV semelhantes ao padrão (figura 17), sendo o pico 2 atribuído ao produto reacional.

Isto porque os resultados preliminares da reação, obtidos pela varredura de espectro na região UV-Vis, revelaram espectros de absorção semelhantes para os picos 1 e 2 (Figura 18), conforme pode ser observado na figura 19.



**Figura 19:** Espectros de absorção UV-Vis, dos picos identificados no cromatograma da reação de acilação enzimática da naringina obtido por CLAE-DAD.

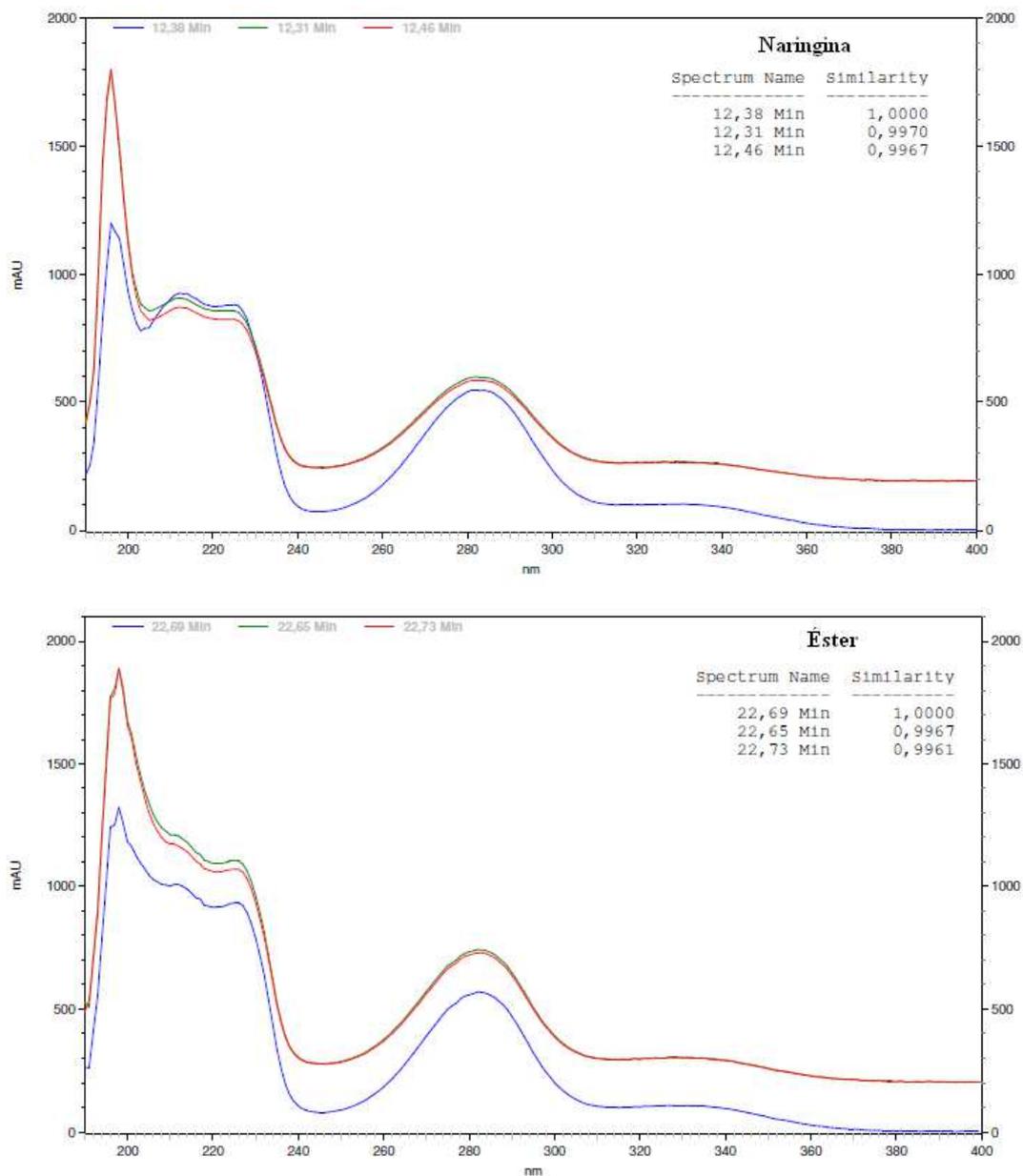
A comparação dos espectros UV sugere que o cromóforo de ambas as substâncias é semelhante, embora se tratem de compostos diferentes, com tempos de retenção distintos. É possível inferir que o composto com tempo de retenção maior, seria o éster produzido durante a reação de acilação enzimática. O éster formado, por apresentar uma cadeia com 18 átomos

de carbono ligados à naringina, fica adsorvido na coluna em fase reversa (altamente apolar) por mais tempo, atrasando sua eluição e conferindo a este composto um tempo de retenção de 22,7 minutos, tempo consideravelmente maior que o observado para a naringina, que elui em 12,5 minutos (o cromatograma padrão da naringina é mostrado na figura 17).

Estes resultados, juntamente com o conhecimento de que a lipase B de *C. antarctica* atua regioselectivamente na porção glicosídica dos flavonoides, torna possível deduzir que a reação de esterificação não alterou o cromóforo, já que qualquer mudança no núcleo flavonoide provocaria deslocamento nas regiões de absorção do espectro, o que não foi observado. Conclui-se, portanto, que a reação tenha ocorrido na porção glicosídica da molécula de naringina, que não interfere na absorção UV-Vis. De acordo com Silvestein et al (1994), um aumento na complexidade da estrutura química de uma molécula, corresponde a um aumento da complexidade dos espectros de infra-vermelho, RMN e massas, mas o mesmo não ocorre necessariamente na espectroscopia UV.

O uso do detector de arranjo de diodos permite ainda estimar a pureza dos compostos detectados no cromatograma. A análise de pureza de cada pico é feita através de varreduras espectrais, examinando e comparando diferentes pontos do pico cromatográfico (geralmente na subida, no ápice e na descida) e calculando-se o índice de similaridade entre os espectros UV (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Este procedimento é útil para descobrir a presença de interferentes eluindo ao mesmo tempo que o analito, possibilitando confirmar a identidade do composto de interesse quando o mesmo é comparado a um padrão. A pureza das substâncias 1 e 2, foram verificadas através da pureza do pico, conforme mostrado na figura 20.



**Figura 20:** Espectros de absorção UV-Vis identificados no cromatograma da reação de acilação enzimática da naringina (naringina e seu éster) obtidos por CLAE-DAD. Os espectros foram obtidos em três diferentes pontos de cada um dos picos e sobrepostos entre si para efeito de comparação de sua similaridade.

#### 4.2.1 Estudo comparativo entre as reações de esterificação e transesterificação sob aquecimento convencional

O propósito deste experimento foi comparar a formação do éster derivado da naringina empregando o ácido ricinoléico e o óleo de mamona como agente acilante. As reações foram realizadas em condições que permitiram avaliar o rendimento da bioconversão ao longo de 120 horas. As áreas originais de todos os cromatogramas estão disponíveis em Anexo (p. 89). As demais condições, como temperatura, concentração enzimática, proporção entre os substratos e solvente utilizado, foram mantidas fixas. Os dados, obtidos em triplicata, foram submetidos à análise de variância.

A análise de variância é uma metodologia estatística que permite observar a existência de diferenças significativas entre as médias de várias amostras de uma variável numérica, determinadas por diferentes tratamentos. Esta metodologia calcula a variabilidade total presente na variável em análise, possibilitando comparar ao mesmo tempo vários grupos que tenham variáveis contínuas, distribuição normal e que os grupos sejam independentes. A estatística de teste é a estatística F, que compara as variâncias e segue uma distribuição F de Snedecor (FERREIRA, 1999).

Ainda de acordo com Ferreira (1999),

$$F = \frac{\text{Variância entre tratamentos}}{\text{Variância residual}} \sim F(\alpha; gl_{num}; gl_{den})$$

Em que:

$\alpha$ , corresponde ao nível de significância, geralmente  $\alpha=0,05$

$gl_{num}$ , corresponde ao número de graus de liberdade do numerador

$gl_{den}$ , corresponde ao número de graus de liberdade do denominador

A tabela 6, a seguir mostra os dados obtidos nos experimentos.

**Tabela 6:** Concentração percentual de éster formado na reação de acilação ao longo de 120 horas.

Agente acilante	Tempo (h)	Bioconversão % (triplicata)			Média	DP
		1	2	3		
Ac ricinoleico	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	7,92	7,83	8,50	8,08	0,36
	48	14,13	14,14	15,33	14,53	0,69
	72	17,74	19,92	20,07	19,24	1,30
	96	19,10	21,08	20,50	20,22	1,02
	120	24,18	23,93	24,24	24,12	0,16
	$F_{\text{tabelado}}(0,05; 5; 12) = 3,11 < F_{\text{calculado}} = 5,83$ $p\text{-value} = 0,01 < \alpha = 0,05$					
Óleo de mamona	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	12,90	11,73	10,52	11,72	1,19
	48	20,15	16,45	17,64	18,08	1,89
	72	24,69	25,08	22,35	24,04	1,48
	96	26,39	25,51	27,92	26,61	1,22
	120	34,48	32,74	30,89	32,70	1,79
	$F_{\text{tabelado}}(0,05; 5; 12) = 3,11 > F_{\text{calculado}} = 1,53$ $p\text{-value} = 0,25 > \alpha = 0,05$					

Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  maiores que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$ , correspondem a diferenças significativas entre as médias. O p-value corresponde ao nível de significância da amostra, se o  $p\text{-value} \leq \alpha = 0,05$  é possível concluir que existem diferenças significativas entre as médias analisadas, com um nível de significância de 5% (TRIOLA, 2005).

Portanto, seguindo este raciocínio, podemos concluir que foram encontradas diferenças significativas no rendimento médio da reação enzimática utilizando o ácido ricinoléico como agente acilante, com um nível de significância de 5% ( $F_{\text{tabelado}} = 3,11 < F_{\text{calculado}} = 5,83$  e  $p\text{-value} = 0,01 < \alpha = 0,05$ ). No segundo caso, quando o óleo de mamona é utilizado como agente acilante para a reação, as variâncias são homogêneas ( $F_{\text{tabelado}} = 3,11 > F_{\text{calculado}} = 1,53$  e  $p\text{-value} = 0,25 > \alpha = 0,05$ ), isto quer dizer que dentro de cada um dos tratamentos a variabilidade deve-se a causas aleatórias.

Depois de concluir por meio do teste F que existe diferença significativa entre tratamentos, é interessante avaliar a extensão destas diferenças por meio de um teste de comparações múltiplas. O teste de Tukey foi utilizado nesta análise de dados porque permite testar os contrastes entre as médias dos tratamentos.

A seguir, temos o teste de Tukey para a variável concentração, da reação de acilação enzimática da naringina com o ácido ricinoléico em 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas (tabela 7).

**Tabela 7:** Teste de Tukey para a variável concentração, da reação de acilação enzimática da naringina com o ácido ricinoléico ao longo de 120 horas

tempo	N	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
0	3	0,000000				
24	3		8,082900			
48	3			14,532733		
72	3				19,244467	
96	3				20,224900	
120	3					24,117533
Sig.		1,000	1,000	1,000	0,611	1,000

As médias para grupos em subconjuntos homogêneos são exibidas na mesma coluna, enquanto as médias estatisticamente diferentes aparecem dispostas em colunas separadas. A média harmônica utilizada é 3,000 e corresponde ao número médio de repetições de cada grupo.

De acordo com os dados contidos na tabela, observa-se que a formação de éster varia significativamente ao longo do tempo, isto é, a cada 24 horas. À exceção dos períodos de 72 e 96 horas, que não apresentaram diferenças significativas entre si. Isto significa que, se tivéssemos que escolher entre 72 e 96 horas de reação, poderia ser mais vantajoso economicamente (pelo dispêndio de energia e tempo no experimento), escolher o período de 72 horas já que o rendimento médio de éster formado neste tempo de reação não difere significativamente da quantidade de éster formada em 96 horas de reação. Em termos absolutos, o tempo que proporcionou a maior quantidade de éster formado foi 120 horas.

Na sequência, temos o teste de Tukey para a variável concentração, da reação de acilação enzimática da naringina com o óleo de mamona em 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas (tabela 8).

**Tabela 8:** Teste de Tukey para a variável concentração, da reação de acilação enzimática da naringina com o óleo de mamona ao longo de 120 horas

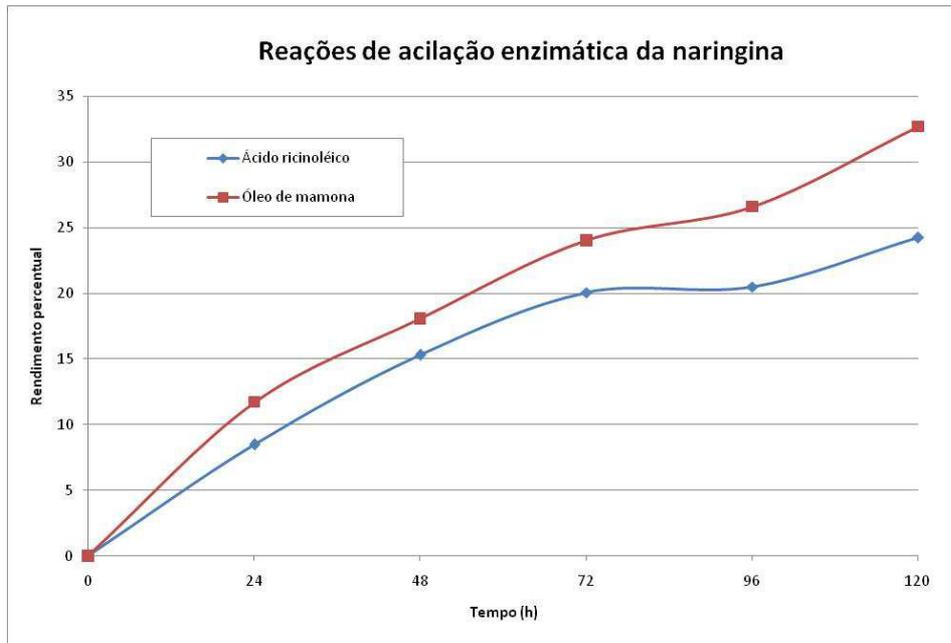
tempo	N	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
0	3	0,000000				
24	3		11,715333			
48	3			18,077700		
72	3				24,039033	
96	3				26,609300	
120	3					32,702867
Sig.		1,000	1,000	1,000	0,289	1,000

Para a reação que empregou o óleo de mamona como agente acilante, embora a estatística F não tenha apontado diferenças significativas entre as médias, o teste de Tukey apresentou diferenças entre os diferentes tempos de reação.

Isto pode acontecer em alguns casos, já que o teste de Tukey é de certa forma independente do teste F. A situação contrária também pode ocorrer, e mesmo que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  seja significativo pode ser que não sejam encontradas diferenças significativas entre contrastes de médias (TRIOLA, 2005).

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos para a reação com o ácido ricinoléico. Neste caso, são válidas as mesmas considerações feitas para o caso anterior. Não podemos descartar ainda, a existência de erros aleatórios no experimento.

A representação gráfica das reações ao longo do tempo está na figura 21.



**Figura 21:** Rendimento percentual obtido nas reações de acilação enzimática da naringina ao longo de 120 horas, comparando o óleo de mamona e ácido ricinoléico como agente acilante, sob aquecimento convencional.

De acordo o gráfico, podemos ver claramente que a reação de esterificação apresenta rendimento menor se comparada à transesterificação. A transesterificação apresenta maior rendimento porque os subprodutos formados não são bons nucleófilos como a água (subproduto da reação de esterificação), e por isso não favorece a reação contrária.

A reação de transesterificação quando desenvolvida com ésteres complexos, como os triglicerídeos presentes nos óleos vegetais, fornece mais subprodutos, como a glicerina e misturas de mono e diacilglicerídeos (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

#### 4.2.2 Estudo comparativo de reações empregando aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas

Este estudo monitorou a formação de éster derivado da naringina utilizando a energia de micro-ondas como fonte de aquecimento, por um período de 12 horas. Paralelamente, a reação foi desenvolvida sob as mesmas condições, utilizando aquecimento convencional. Os dados obtidos são mostrados na tabela 9.

**Tabela 9:** Concentração percentual de éster formado na reação de acilação ao longo de 12 horas.

<b>Aquecimento por micro-ondas</b>						
Agente acilante	Tempo (h)	Bioconversão % (triplicata)			Média	DP
		1	2	3		
Ac ricinoleico	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	2,07	2,50	2,35	2,30	0,22
	4	2,67	2,57	2,97	2,74	0,21
	6	2,92	3,18	3,92	3,34	0,52
	8	3,21	3,53	4,21	3,65	0,51
	10	3,42	3,95	-*	3,69	0,37
	12	3,77	4,09	4,01	3,96	0,16
$F_{\text{tabelado}}(0,05; 6; 13) = 2,92 < F_{\text{calculado}} = 3,16$ $p\text{-value} = 0,04 < \alpha = 0,05$						
Óleo de mamona	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	3,45	2,14	2,52	2,70	0,67
	4	4,98	3,21	4,38	4,19	0,90
	6	6,06	4,19	4,97	5,07	0,94
	8	6,91	5,05	6,05	6,00	0,93
	10	9,06	6,50	6,88	7,48	1,38
	12	9,38	8,05	9,14	8,86	0,71
$F_{\text{tabelado}}(0,05; 6; 14) = 2,85 > F_{\text{calculado}} = 1,40$ $p\text{-value} = 0,28 > \alpha = 0,05$						
<b>Aquecimento convencional</b>						
Agente acilante	Tempo (h)	Bioconversão % (triplicata)			Média	DP
		1	2	3		
Ac ricinoleico	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	1,35	0,60	0,97	0,97	0,38
	4	2,19	1,56	2,02	1,93	0,32
	6	2,61	2,41	2,92	2,65	0,26
	8	3,38	3,14	3,83	3,45	0,35
	10	4,21	3,93	4,86	4,33	0,48
	12	4,75	5,53	5,33	5,20	0,40
$F_{\text{tabelado}}(0,05; 6; 14) = 2,85 > F_{\text{calculado}} = 1,51$ $p\text{-value} = 0,25 > \alpha = 0,05$						
Óleo de mamona	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	2,81	1,16	1,14	1,70	0,96
	4	4,69	3,12	2,97	3,59	0,95
	6	5,75	5,11	4,04	4,97	0,86
	8	6,81	6,40	5,12	6,11	0,88
	10	7,87	6,95	6,16	6,99	0,86
	12	8,64	7,27	6,74	7,55	0,98
$F_{\text{tabelado}}(0,05; 6; 14) = 2,85 > F_{\text{calculado}} = 1,62$ $p\text{-value} = 0,21 > \alpha = 0,05$						

\* Dado excluído do experimento por ser considerado "outlier"

De acordo com a estatística de teste F, não houve diferenças significativas para os conjuntos de médias analisados, pois  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$  e  $p\text{-value} < \alpha$ , à exceção do experimento que utilizou o ácido ricinoléico como agente acilante e a irradiação por micro-ondas como fonte de aquecimento.

Seguindo com o teste de Tukey para a variável concentração ao longo do tempo, algumas médias aparecem agrupadas em uma mesma coluna indicando, portanto, que não existem diferenças significativas na formação de éster a cada duas horas. Diferenças mais significativas podem ser notadas nos grupos mais distantes entre si, a cada quatro horas por exemplo. Isto se deve ao fato de que a reação de esterificação de flavonoides catalisada por lipase, possui um tempo de equilíbrio relativamente grande, sendo que a maioria dos estudos descritos na literatura emprega o tempo de 5 a 7 dias de reação. Entretanto, para efeitos de estudo comparativo entre as diferentes fontes de aquecimento, fez-se um recorte de tempo menor. Estes resultados estão dispostos na tabela 10.

**Tabela 10:** Teste de Tukey para a variável concentração da reação de acilação enzimática da naringina, no período de 12 horas.

<b>Aquecimento por micro-ondas</b>									
Agente acilante	tempo	N	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$						
			1	2	3	4			
Acico ricinoleico*	0	3	0,000000						
	2	3		2,304767					
	4	3		2,738200	2,738200				
	6	3			3,340200	3,340200			
	8	3			3,650700	3,650700			
	10	2			3,685400	3,685400			
	12	3				3,957433			
	Sig.			1,000	0,714	0,056	0,355		
	tempo	N	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$						
			1	2	3	4	5		
Óleo de mamona	0	3	0,116667						
	2	3		2,703200					
	4	3		4,187833	4,187833				
	6	3		5,074067	5,074067	5,074067			
	8	3			6,000733	6,000733			
	10	3				7,476333	7,476333		
	12	3					8,855600		
	Sig.			1,000	0,063	0,226	0,058	0,504	
<b>Aquecimento convencional</b>									
Agente acilante	tempo	N	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$						
			1	2	3	4	5	6	
Acico ricinoleico	0	3	0,000000						
	2	3		0,974200					
	4	3		1,925233	1,925233				
	6	3			2,647633	2,647633			
	8	3				3,451500	3,451500		
	10	3					4,332233	4,332233	
	12	3						5,198700	
	Sig.			1,000	0,053	0,208	0,131	0,082	0,090
	tempo	N	Subconjuntos para $\alpha = 0.05$						
			1	2	3	4	5		
Óleo de mamona	0	3	0,000000						
	2	3	1,702667	1,702667					
	4	3		3,591267	3,591267				
	6	3			4,967967	4,967967			
	8	3				6,111133	6,111133		
	10	3				6,992733	6,992733		
	12	3					7,547633		
	Sig.			0,247	0,163	0,463	0,118	0,417	

\* A média harmônica deste conjunto é 2,8 - menor que as demais devido à perda de um dado.

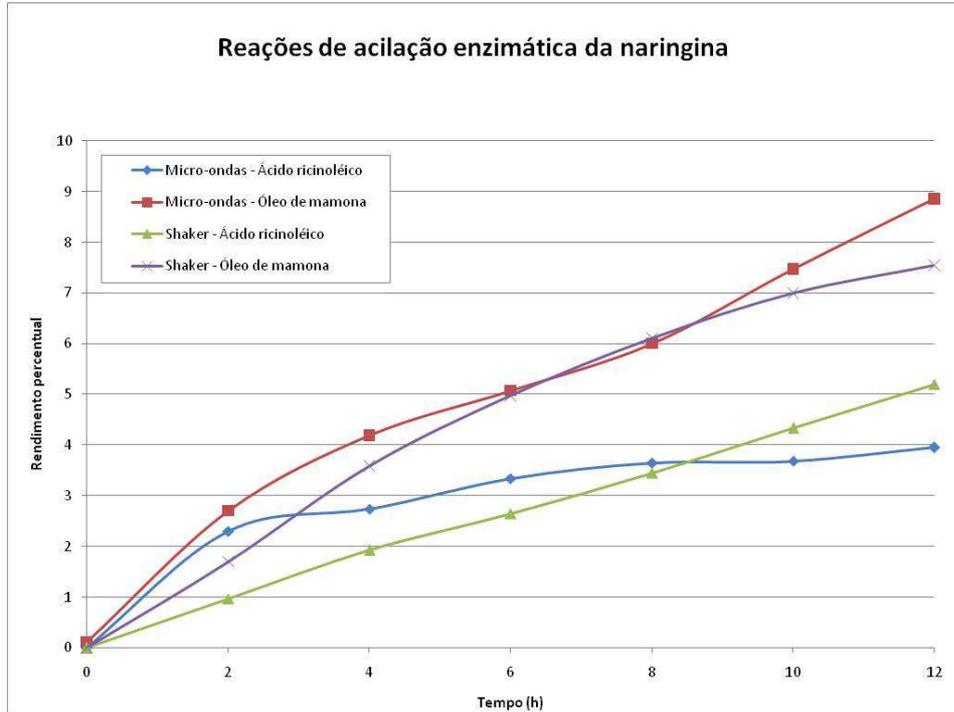
Para investigar a influência da fonte de aquecimento na produção de éster, procedeu-se novamente ao teste de comparações múltiplas para os diferentes experimentos. A análise completa consta na tabela 11.

**Tabela 11:** Teste de Tukey para a reação de acilação enzimática da naringina no período de 12 horas, comparando diferentes fontes de aquecimento.

(I) variedade	(J) variedade	Diferença entre médias (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%	
					Limite Inferior	Limite Superior
Ac ricinoleico - micro-ondas	Ac ricinoleico - shaker	0,119929	0,2119606	0,942	-0,441630	0,681487
	Oleo mamona - micro-ondas	-2,149348*	0,2119606	0,000	-2,710906	-1,587789
	Oleo mamona - shaker	-1,649200*	0,2119606	0,000	-2,210758	-1,087642
Ac ricinoleico - shaker	Ac ricinoleico - micro-ondas	-0,119929	0,2119606	0,942	-0,681487	0,441630
	Oleo mamona - micro-ondas	-2,269276*	0,2093597	0,000	-2,823944	-1,714608
	Oleo mamona - shaker	-1,769129*	0,2093597	0,000	-2,323796	-1,214461
Oleo mamona - micro-ondas	Ac ricinoleico - micro-ondas	2,149348*	0,2119606	0,000	1,587789	2,710906
	Ac ricinoleico - shaker	2,269276*	0,2093597	0,000	1,714608	2,823944
	Oleo mamona - shaker	0,500148	0,2093597	0,091	-0,054520	1,054816
Oleo mamona - shaker	Ac ricinoleico - micro-ondas	1,649200*	0,2119606	0,000	1,087642	2,210758
	Ac ricinoleico - shaker	1,769129*	0,2093597	0,000	1,214461	2,323796
	Oleo mamona - microondas	-0,500148	0,2093597	0,091	-1,054816	0,054520

\* A diferença entre as médias é significativa a 5%. O termo de erro das médias quadradas (Erro) = 0,460.

Com base no teste de Tukey, conclui-se que não houve diferença significativa no rendimento das reações quando submetida à irradiação por micro-ondas. As diferenças são significativas quanto ao agente acilante, de modo que foram obtidos melhores resultados com o óleo de mamona. A representação gráfica das reações pode ser vista na figura 22.



**Figura 22:** Rendimento percentual obtido nas reações de acilação enzimática da naringina em 12 horas, comparando o óleo de mamona e ácido ricinoléico como agente acilante, sob aquecimento convencional e por micro-ondas.

O perfil da reação observado no gráfico é semelhante ao obtido na reação enzimática ao longo de 120 horas, com vantagem na produção de éster para a reação de transesterificação.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO

Para a confirmação estrutural do produto de reação, procedeu-se à purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN uni e bidimensionais, juntamente com o substrato de partida da reação, a naringina, para efeito de comparação. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  - DEPT da naringina e seu éster são mostrados nas figuras 23 a 31.



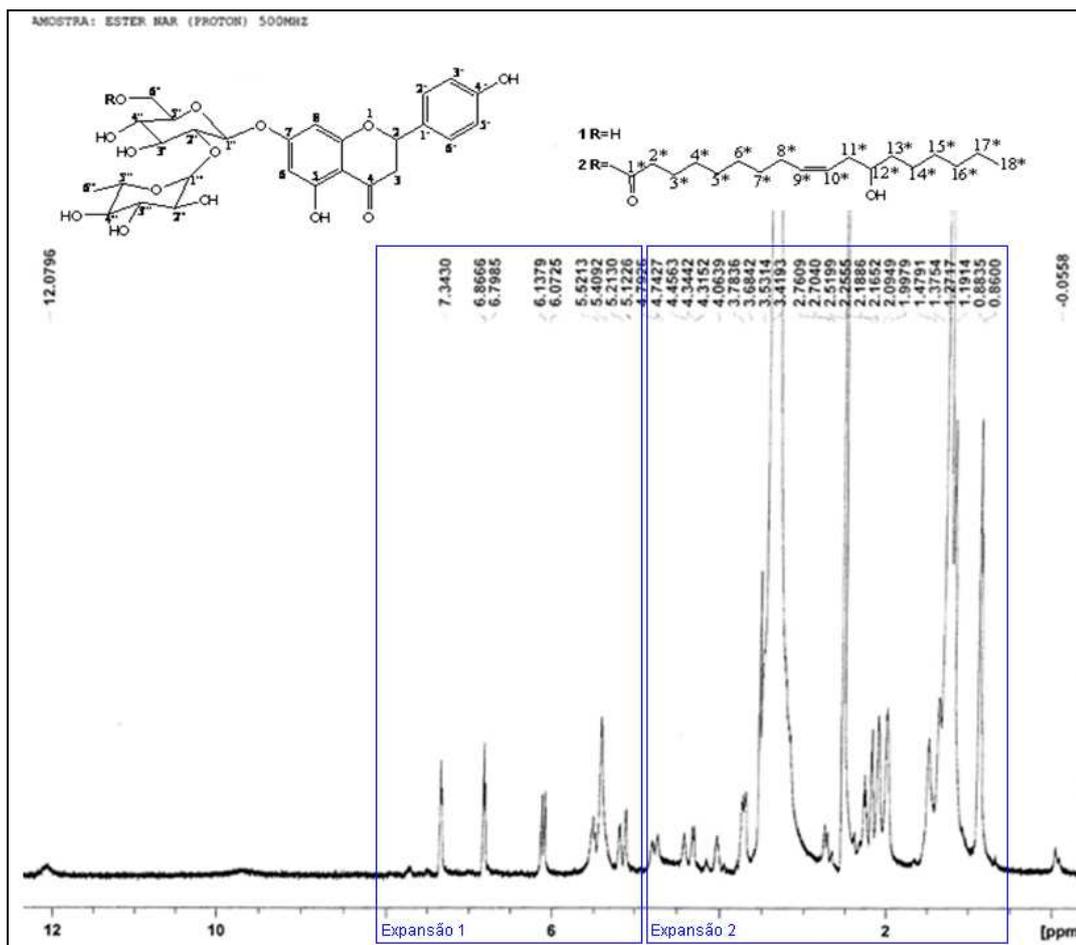


Figura 25: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO}_d_6$ )

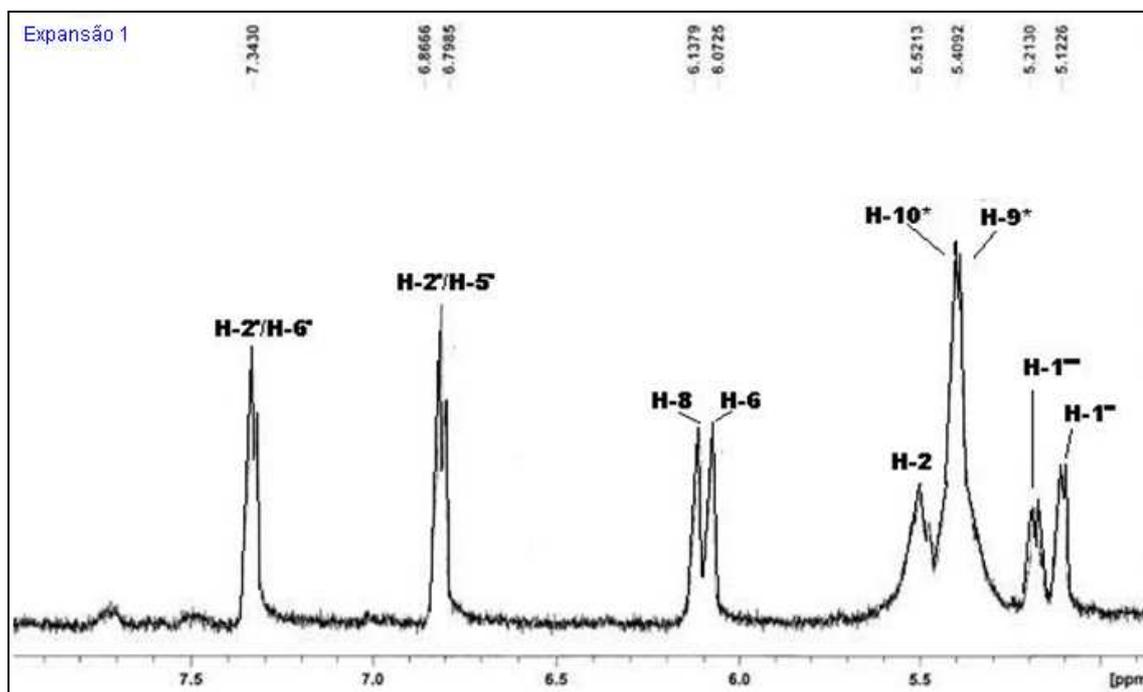


Figura 26: Ampliação entre as regiões 5 a 8 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO}_d_6$ )

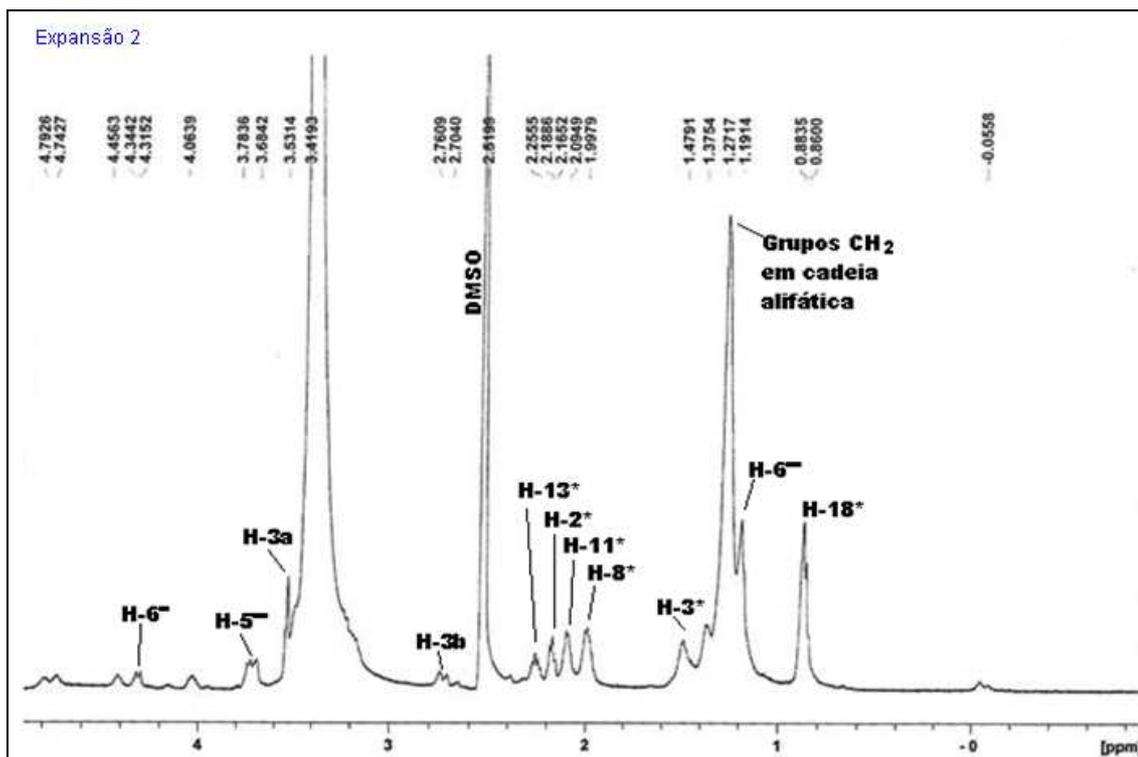


Figura 27: Ampliação entre as regiões 0 a 5 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO}_d_6$ )

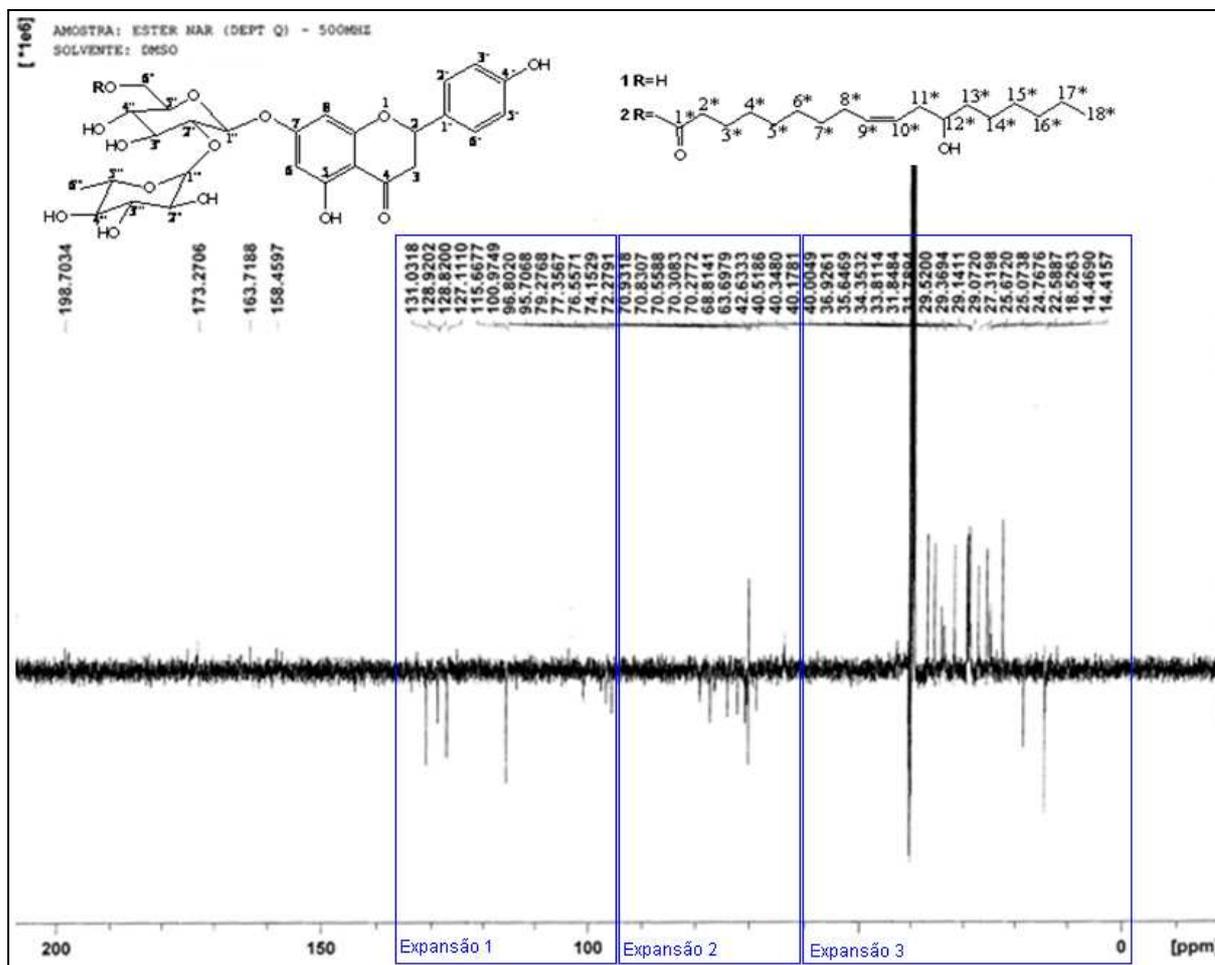


Figura 28: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO}_d_6$ )

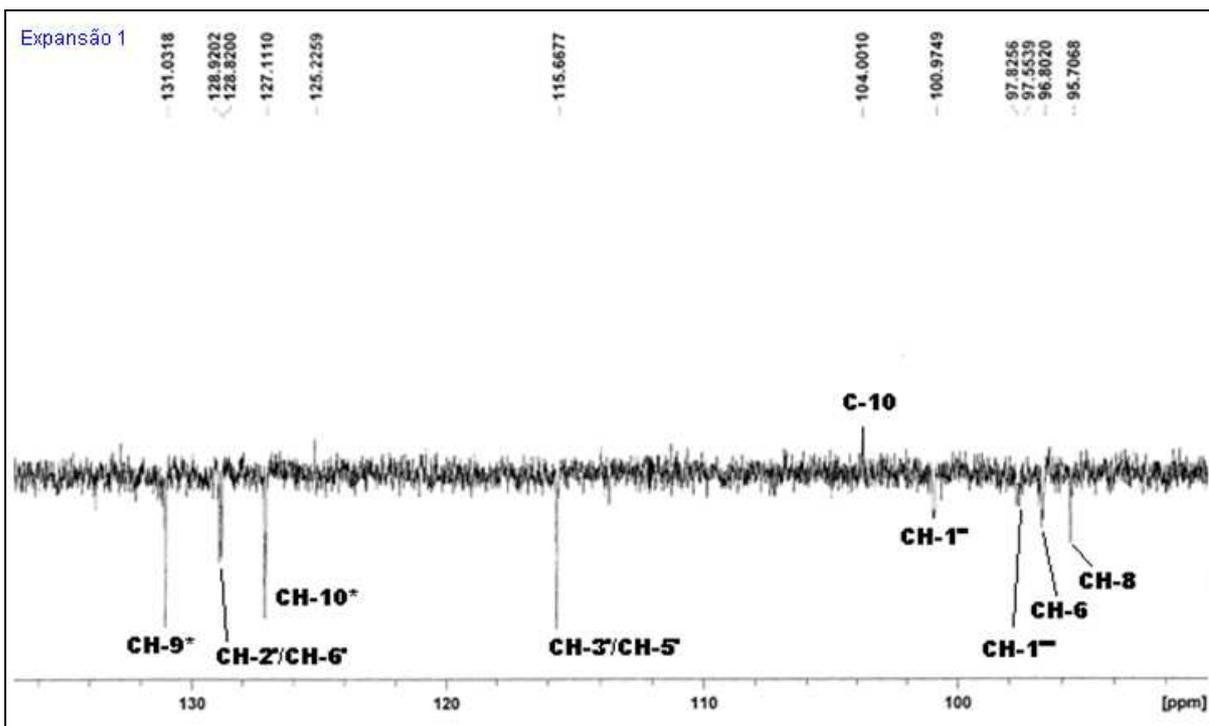


Figura 29: Ampliação entre as regiões 90 a 140 ppm do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

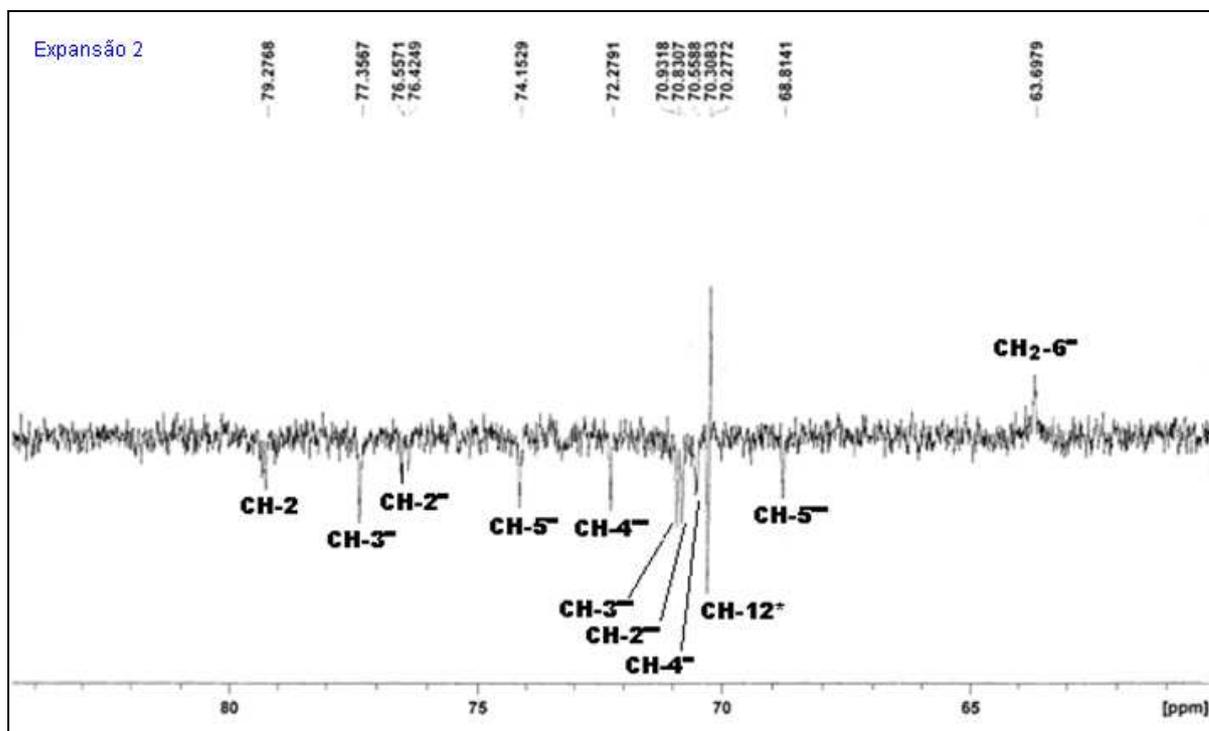
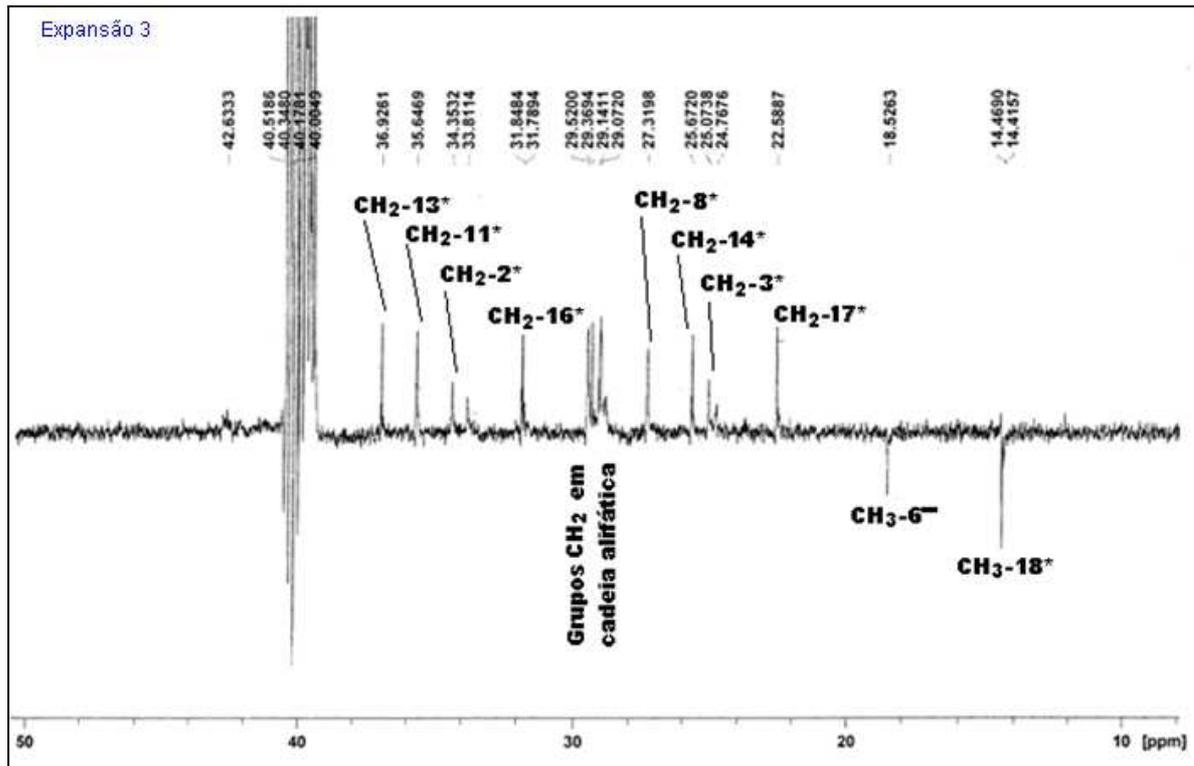


Figura 30: Ampliação entre as regiões 60 a 85 ppm do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



**Figura 31:** Ampliação entre as regiões 10 a 50 ppm do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT do éster da naringina (500MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da naringina (figura 23) forneceu sinais característicos do núcleo flavonoide, como em  $\delta_{\text{H}}$  12,06 ppm, atribuído ao hidrogênio do grupo hidroxila, do carbono C-5, envolvido em ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila da posição C-4, e com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  9,64 ppm, referente à hidroxila presente em C-4'. Também foram observados dois dubletes centrados em  $\delta_{\text{H}}$  7,33 ppm (2H, d, H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,81 ppm (2H, d, H-3' e H-5'), na região de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos presentes no anel B. Assim como os sinais  $\delta_{\text{H}}$  6,12 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  6,09 ppm, referentes aos hidrogênios da posição H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Além destes sinais, foram observados sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,51 ppm (1H, t,  $J = 12,8$  Hz, H-2) e  $\delta_{\text{H}}$  3,18 ppm (1H, m, H-3<sub>eq</sub>) e  $\delta_{\text{H}}$  2,73 ppm (1H, m, H-3<sub>ax</sub>) relacionados ao anel C do núcleo flavanona.

O RMN de  $^{13}\text{C}$  - DEPT é uma técnica que mede a intensificação da distorção por transferência de polarização e é utilizada na determinação do número de átomos de hidrogênio ligados a  $^{13}\text{C}$ . Átomos de carbono com um, dois ou três hidrogênios ligados exibem fases diferentes quando são registrados. Nos espectros de DEPT comuns, vemos picos normais em todos os carbonos quaternários e metileno e picos invertidos em todos os carbonos metina e metila (PAVIA et al, 2010). A inversão de sinais de no experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT permitiu identificar os grupos -CH presentes na porção glicosídica da naringina (figura 24),

assim como os grupos  $-\text{CH}_2$  oriundos do ácido ricinoléico, presentes no éster formado (figuras 29 a 31).

Na análise de RMN de  $^1\text{H}$  do éster produzido na reação (figuras 25 a 27), foi observado o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 ppm referente a H-2' e H-6', o sinal  $\delta_{\text{H}}$  6,87 ppm referente a H-3' e H-5' (anel B) e os sinais  $\delta_{\text{H}}$  6,14 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  6,07 ppm, referentes aos hidrogênios das posições H-6 e H-8. O espectro também apresentou sinal característico de grupos metílicos arranjados em cadeia (provenientes do ácido ricinoléico), com um pico largo em  $\delta_{\text{H}}$  1,27 ppm.

Para uma melhor determinação estrutural da molécula de naringina e seu éster, foram utilizadas técnicas bidimensionais de correlação de desvio heteronuclear HSQC (Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por uma ligação,  $^1J_{\text{CH}}$ ) e HMBC (Correlação de Acoplamento Heteronuclear espaçado por várias ligações,  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). Os espectros são mostrados nas figuras 32 a 35.

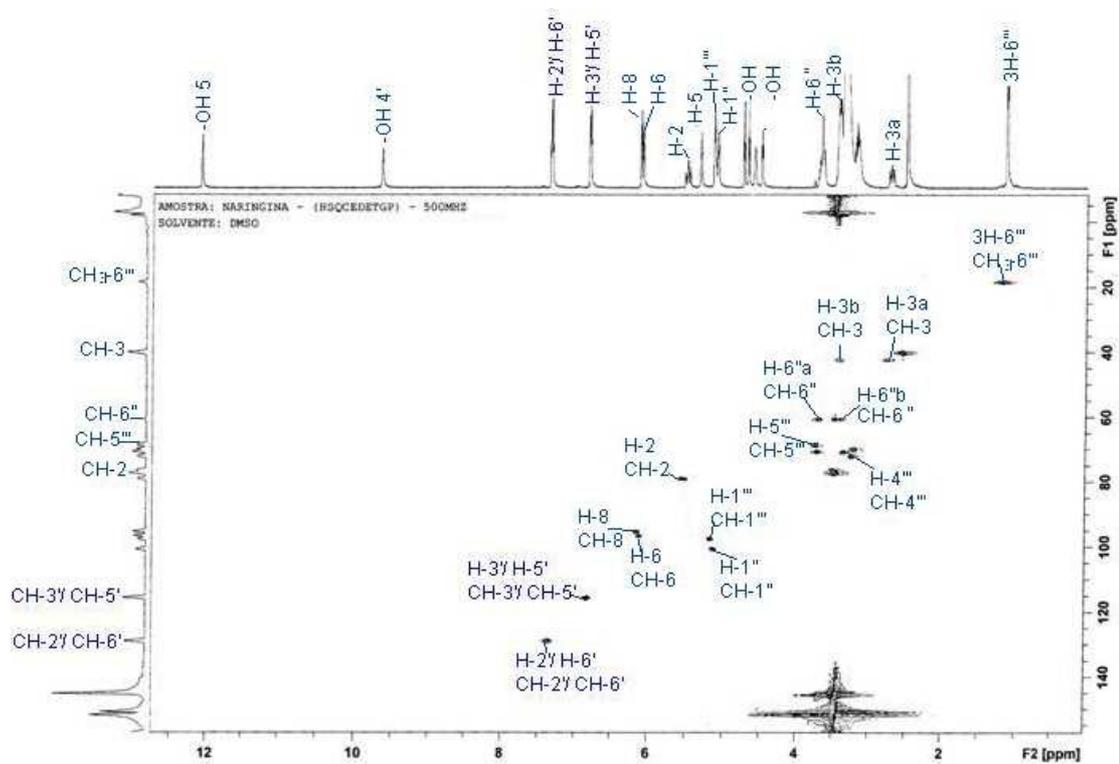


Figura 32: Espectro de correlação HSQC da naringina (500MHz, DMSO<sub>6</sub>)

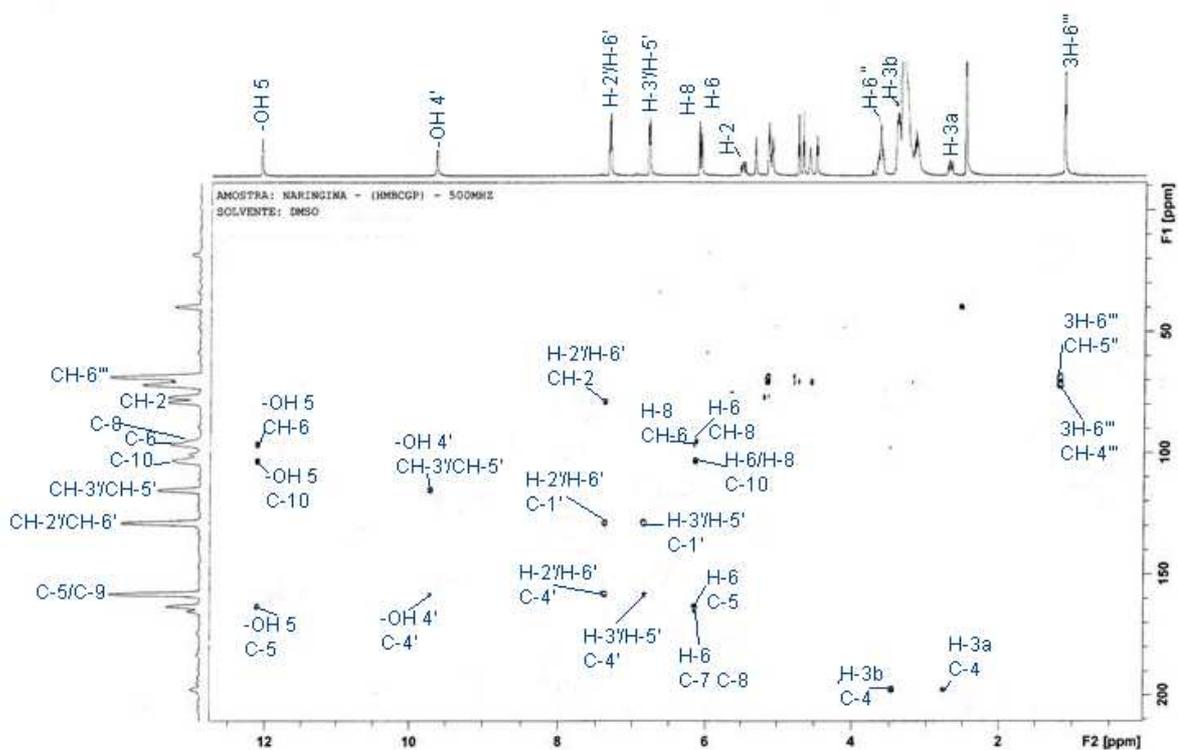


Figura 33: Espectro de correlação HMBC da naringina (500MHz, DMSO<sub>6</sub>)

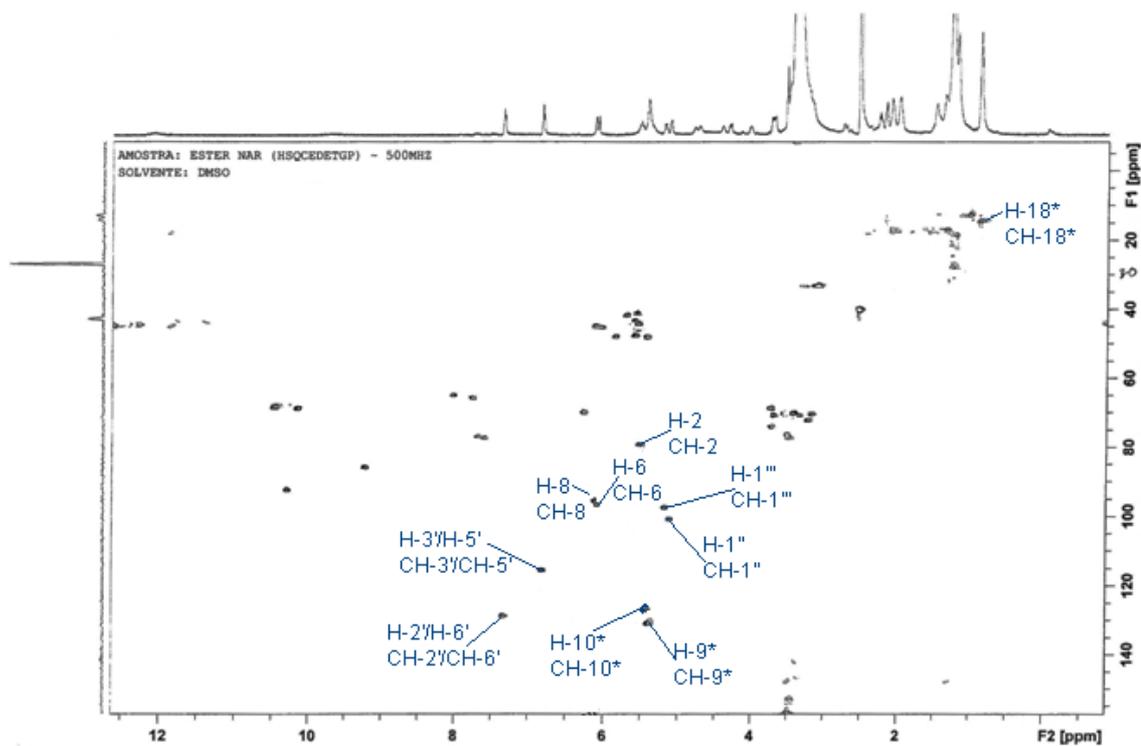


Figura 34: Espectro de correlação HSQC do éster da naringina (500MHz, DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>)

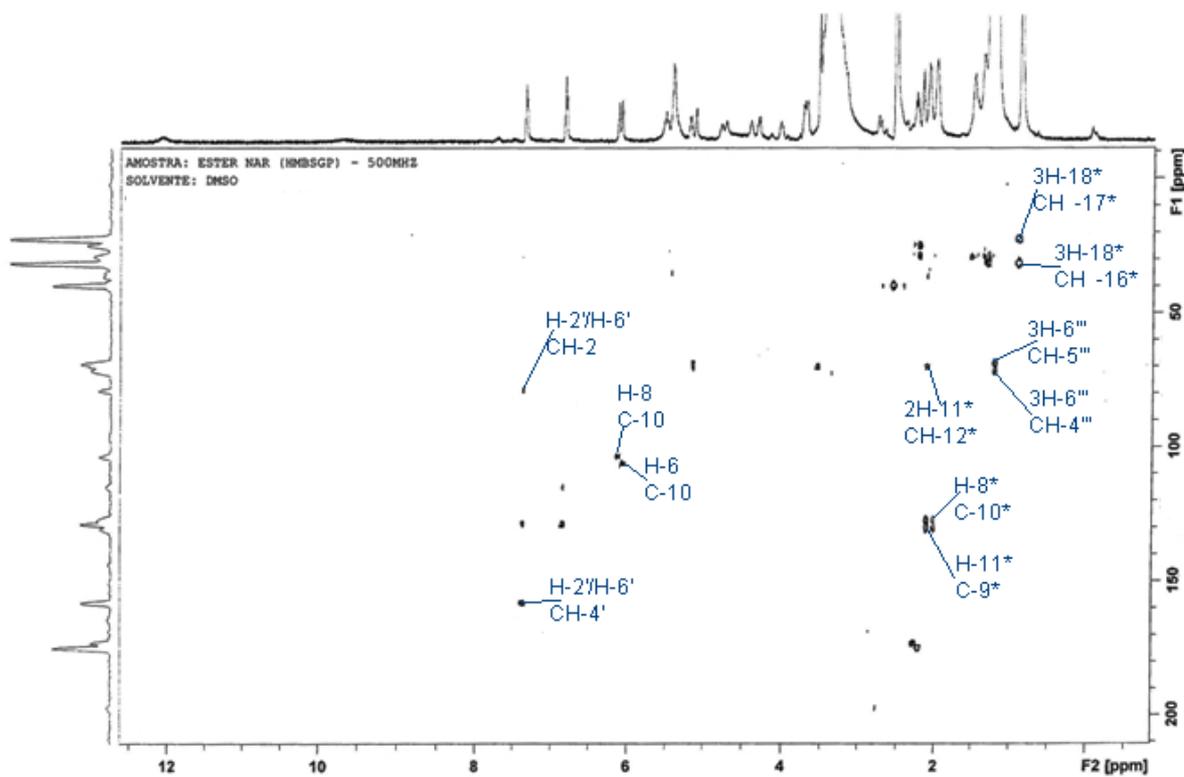
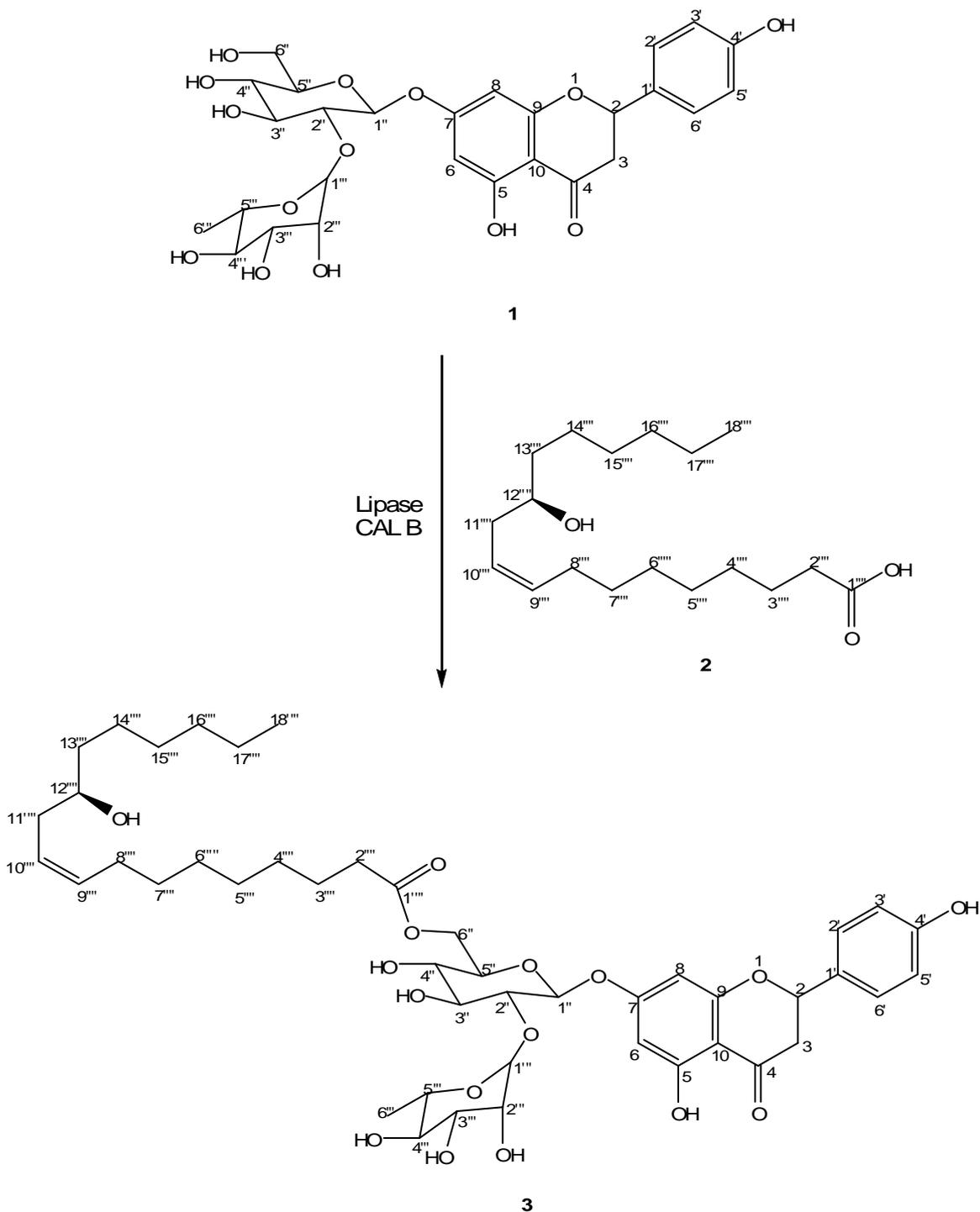


Figura 35: Espectro de correlação HMBC do éster da naringina (500MHz, DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>)

Os espectros de correlação permitiram confirmar as atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para a naringina e seu éster. Todos estes dados foram reunidos e estão dispostos na tabela 12. A representação esquemática da reação encontra-se na figura 36.



**Figura 36:** Acilação enzimática da naringina (1) com o ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecênico (2) e o éster produzido na reação (3).

**Tabela 12:** Dados de RMN para comparação entre a naringina e seu éster.

Posição	Naringina (DMSO <sub>d6</sub> , 400MHz)				Éster naringina (DMSO <sub>d6</sub> , 500MHz)			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	79.32	5.51		H-2'/H-6'	79.29	5.52 (m)		H-2'/H-6'
3 <sub>ab</sub>	42.49	3.40, 2.73 (m)			42.69	3.25, 2.70		
4	197.97	-			198.70	-		
5	163.41	-	HO-5; H-6		165.24	-		
6	96.77	6.09 (s)		HO-5; H-8	96.80	6.07 (s)		
7	165.32	-	H-6; H-8		166.70			
8	95.58	6.11 (s)		H-6	95.71	6.14 (s)		
9	163.16	-			163.71	-		
10	103.70	-		HO-5; H-6; H-8	104	-		H-6; H-8
1'	128.97	-	H-2'/H-6'	H-3'/H-5'		-		
2'/6'	129.08	7.34 (d)			128.92	7.34 (d)		
4'	158.60	-	HO-4'; H-3'/H-5'	H-2'/H-6'	158.46	-		H-2'/H-6'
3'/5'	116.44	6.81 (d)		HO-4'	115.67	6.80 (d)		
HO-5	-	12.07 (s)			-	12.09		
HO-4'	-	9.68 (s)			-	9.78		
1''	100.89	5.11 (m)			100.97	5.12		
2''	76.69	3.20		H-1'''	76.65	3.49		
3''	77.59	3.50			77.35	3.45		
4''	70.03	3.30			70.56	3.40		
5''	77.53	3.72			74.22	3.75		
6'' <sub>ab</sub>	60.88	3.70			63.70	4.35		
1'''	97.85	5.16 (m)			97.82	5.21		
2'''	70.93	3.70			70.94	3.40		
3'''	70.85	3.35			70.63	3.70		
4'''	72.27	3.25		3H-6'''	72.28	3.25		3H-6'''
5'''	68.78	3.70	3H-6'''	H-1'''	68.81	3.75	3H-6'''	
6'''	18.53	1.14 (m)			18.53	1.19		
1''''	-	-			173.27	-	2H-2*	
2''''	-	-			34.35	2.17 (m)		
3''''	-	-			25.07	1.48 (m)	2H-2*	
4'''' -	-	-			29.14-29.37	1.27		
7''''								
8''''	-	-			27.32	1.99 (m)		
9''''	-	-			131.03	5.30	2H-8*	2H-11*
10''''	-	-			128.22	5.50	2H-11*	2H-8*
11''''	-	-			35.64	2.09 (t)		
12''''	-	-			70.21	3.40		
13''''	-	-			36.93	2.25		2H-11*
14''''	-	-			25.67	1.27		
15''''	-	-			29.52 <sup>a</sup>	1.27		
16''''	-	-			31.84	1.27		3H-18*
17''''	-	-			22.57	1.27	3H-18*	
18''''	-	-			14,49	0.85 (t)		

Com base nos dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo os espectros bidimensionais, foi possível observar algumas diferenças importantes. O sinal  $\delta_{\text{C}}$  60,88 ppm atribuído a C-6" na molécula de naringina sofreu deslocamento no espectro do éster passando a  $\delta_{\text{C}}$  63,7 ppm, com uma variação de 2,82 ppm. De modo semelhante, o sinal atribuído a C-5",  $\delta_{\text{C}}$  77,53 ppm para a naringina, apareceu em  $\delta_{\text{C}}$  74,22 ppm para o seu éster, variando 3,31 ppm. No entanto, não foram observadas alterações nos deslocamentos das posições C-1", C-2", C-3" e C-4" da glicose ou nos sinais atribuídos à ramnose. Estes resultados sugerem a presença de uma ligação éster na posição C-6", elucidando a posição da acilação.

Estas informações estão de acordo com os resultados obtidos por Kontogianni et al (2001), que observou fenômeno semelhante na síntese do decanoato de naringina. Os valores obtidos em ambos os estudos foram comparados na tabela 13.

**Tabela 13:** Alterações nos deslocamentos químicos da RMN  $^{13}\text{C}$  na região glicosídica para a naringina e seu éster.

$\delta_{\text{C}}$	Pesquisa experimental		Kontogianni et al (2001)	
	Naringina	Éster	Naringina	Éster
5"	77,53	74,22	76,2	73,6
6"	60,88	63,70	60,4	63,1

Observando ainda as informações da tabela 12, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do éster formado, o sinal  $\delta_{\text{C}}$  173,27 ppm, atribuído à carbonila da posição C-1\*, foi bastante deslocado se comparado ao sinal  $\delta_{\text{C}}$  179,16 ppm, referente à carbonila na posição C-1 do ácido ricinoléico (tabela 5, pág. 51). Este resultado possibilitou observar a formação de uma ligação éster entre a hidroxila primária na posição C-6" da naringina e o resíduo carboxila na posição C-1' do ácido ricinoléico. A ligação éster desblinda o carbono C-6" envolvido na ligação aumentando seu deslocamento no espectro, devido à eletronegatividade do oxigênio.

A especificidade da reação de acilação pode ser atribuída à preferência da lipase B de *C. antarctica* para grupos hidroxila primários, como o presente na posição C-6" livre da glicose na molécula de naringina, conforme discutido anteriormente.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atividades convergentes entre a diversidade biológica e a química oferecem um maravilhoso caminho para a descoberta de novos produtos bioativos, além de possibilitar a melhoria de moléculas já utilizadas com finalidade terapêutica. Reações de biocatálise, envolvendo micro-organismos ou suas enzimas isoladas, fornecem um método alternativo na obtenção de valiosos produtos naturais que ocorrem na natureza em baixas quantidades ou mesmo na criação de “moléculas novas”, unindo espécies químicas pré-existentes.

A acilação enzimática da naringina com o óleo de mamona, utilizando lipase B de *C. antarctica*, forneceu o ricinoleato de naringina, composto inédito na literatura. Como há poucos estudos sobre a acilação enzimática de flavonoides empregando ácidos graxos hidróxi-insaturados, estes resultados fornecem importante contribuição com dados espectroscópicos e elucidação estrutural.

Os resultados sugerem ainda, que ésteres lipofílicos de flavonoides glicosilados podem ser obtidos via transesterificação enzimática, a partir de óleos vegetais. Os flavonoides modificados podem ser utilizados em preparações cosméticas, farmacêuticas ou em alimentos gordurosos, explorando suas propriedades antioxidantes ou mesmo como conservante natural nas formulações. A obtenção de novos derivados lipofílicos de flavonoides empregando óleo vegetal como doador de acila, dependerá da escolha do óleo com base em sua composição.

Por isso, estudos futuros poderão investigar, além da obtenção de novos ésteres, suas propriedades biológicas, a otimização das condições reacionais para melhorar o rendimento da reação e as etapas de purificação e até mesmo sua aplicabilidade em produtos próprios para consumo.

## REFERÊNCIAS

- ANTHONISEN, D. Sistemas de produção da mamona: co-produtos da mamona. **Sistemas de Produção**. Embrapa Clima Temperado, 11. ISSN 1806-9207 - Versão Eletrônica HTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/co\_produtos.htm>. Acesso em: 11 maio 2009.
- ARCT, J.; PYTROWSSKA K. Flavonoids as component of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**. v.26, p.347-357, 2008.
- ARDHAOUI, M. et al. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.29, n.1-6, p.63-67, 2004a.
- ARDHAOUI, M. et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. **Journal of Biotechnology**. v.110, p.265-271, 2004b.
- ARROYO, M. et al. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24, n. 1-2, p. 3-12, 1999.
- BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Tradução por George G. Ortega et al. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BOGDAL, D. **Microwave-assisted organic synthesis: one hundred reaction procedures**. 1.ed. Oxford: Elsevier, 2005.
- BOHM, B. A. Human uses of flavonoids. In: Bohm, B. A. **Introduction to flavonoids**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 1998. p.365-393.
- BOK, S-H. et al. Effects of naringin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol fed rats. **Nutrition Research**. v.20, n.7, p. 1007-1015, 2000.
- BRADDOO, S. et al. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**. v.51, p.115-120, 2002.
- CABRERA, Z. et al. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.57, n.1-4, p.171-176, 2009.
- CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. **Química Nova na Escola**. v. 32, n.1 , 2010.
- CHAMOULEAU, F. et al. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, n.4-6, p. 949-954, 2001.
- CHEBIL, L. et al. Enzymatic acylation of flavonoids. **Process Biochemistry**, v.41, p.2237-2251, 2006.

CHEBIL, L. et al. Enzymatic acylation of flavonoids: effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, p.9496-502, 2007.

CONCEIÇÃO, M. M. et al. Rheological Behavior of Castor Oil Biodiesel. **Energy Fuels**. v.19, n.5, p. 2185–2188, 2005.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.26, p.343–356, 2005.

DANIELLI, B. et al. Regioselective catalyzed by acylation of polyhydroxylated natural compounds *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.3, p.193-201, 1997.

DANIELLI, B.; RIVA, S. Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products. **Pure and Applied Chemistry**. v. 66, n. 10/11, p. 2215-2218, 1994.

DEARDEN, J. C. Partitioning and Lipophilicity in Quantitative Structure-Activity Relationships. **Environmental Health Perspectives**. v.61, p.203-228, 1985.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2.ed. Baffins Lane; Chichester; West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65. n. 4. p. 337-353, 1999.

ELLAIAH, P. et al. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**. v.39, p.525–528, 2004.

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

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5. ed. Berlin: Springer, 2004.

FANG, T. et al. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.40, n. 2, p.454-459, 2006.

FERNANDEZ, V. G.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.40, p.111–120, 2006.

FERREIRA, A. M. **SPSS, manual de utilização**. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 1999.

FREIRE, R.M.M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D.M.P. e LIMA, E.F. (Orgs.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2001. p. 295-335.

GAO, C. et al. Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 71, n.3, p.235–243, 2001.

GAYOT, S.; SANTARELLI, D.; 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.

GIANNUZZO, A. N. et al. Extracción de naringina de *Citrus paradisi* L. estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 20, n. 2, ago. 2000.

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.5, n.2, p. 211-232, 1996.

GUPTA, N. Enzyme function in organic solvents. **European Journal of Biochemistry**. v.203, n. 1-2, p.25-32, 1992.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.64, p.763-781, 2004.

GUYOT, E. et al. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**. v.19, n.6, p.529-532, 1997.

HALLING, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme and Microbial Technology**. v.16, p.178-206, 1994.

HAN, S. S.; YOU, I. J. Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. **The Korean journal of mycology**. v.16, p.33-40, 1988.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p.481-504, 2000.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p.235-251, 2006.

HAVSTEEN, B. H.; The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v.96, p.67-202, 2002.

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

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**. v.37, p.937-942, 1999.

ISHIHARA, K. et al. Enzyme-catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of Their Functions. **Plant Biotechnology**. v. 19, p.211-214, 2002.

- JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, p.390–397, 2002.
- JAEGER, K.-E.; REETZ M.T. Microbial lipases form versatile tools in biotechnology. **Trends Biotechnology**. v.16, p.396-403, 1998.
- JEWUR, S. S. Química de zeólitas e biocatálise. **Química Nova**. v.8, n.2, p.99-104, abr. 1985.
- 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, n.4, p. 491-503, June 2006.
- KAUL, T. N.; MIDDLETON, J.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal of Medical Virology**. v.15, p.71-79, 1985.
- KIM, S-H. et al. Naringin suppresses the mitogenic effect of lysophosphatidylcholine on vascular smooth muscle cells. **Nutrition Research**. v.23, p.1671–1683, 2003.
- KONTOGIANNI, A. et al. Lipase-catalysed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.21, p. 59-62, 2003.
- KONTOGIANNI, A. et al. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v.103, n.10, p.655–660, 2001.
- KRISHNA, S H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**. v. 20, p. 239–267, 2002.
- LAANE, C. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 30, n. 1, p. 81–87, July 1987.
- LIN, G.; LIN, W-Y. Microwave-Promoted Lipase-Catalyzed Reactions. **Tetrahedron Letters** v.39, p.4333-4336, 1998.
- LORTIE, R. Enzyme Catalyzed Esterification. **Biotechnology Advances**. v. 15, n. 1. p. 1-15. 1997.
- LUE, B-M.; GUO, Z.; XU, X. Effect of room temperature ionic liquid structure on the enzymatic acylation of flavonoids. **Process Biochemistry**. v. 45, n. 8, p. 1375-1382, August 2010.
- LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**. v.15, p. 2743–2748, 2004.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. *In*: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. (Org.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 1194 p.

MARTIN et al. Antiulcer Effect of Naringin on Gastric Lesions Induced by Ethanol in Rats. **Pharmacology**. v.49, n.3, p. 144-50, 1994.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria**. v. XVII, n.6, p. 271-278, 2002.

MATEO et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MELLOU, F. et al. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. **Journal of Biotechnology**. v.116, p.295-304, 2005.

MELLOU, F. et al. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 9, p.2029-2034, September 2006.

MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Amerind. 1986. p. 65-92.

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, n.1, p. 105-107, 1999.

NAKAJIMA, N. et al. Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 90, n. 3, p. 347-349, 2000.

NEGRET, F. Brasil - Mamona, Biocombustível e Agricultura Familiar no Semi-Árido. **Adital**. 26.02.08 - BRASIL. Disponível em: < <http://www.adital.org.br/site/noticia.asp?lang=>

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.74, p.418–25, 2001.

OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 91, n. 2, p.109-116, 2001.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**. v.97, n.9, p.1086-109, June 2006.

OLIVEIRA, E. B. et al. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.59, n. 1-3, p. 96-105, July, 2009.

OTTO, R. T. et al. Novel Flavone Glycoside Derivatives for use in Cosmetics, Pharmaceuticals and Nutrition. US Pat. 20030170186A1, 11 Sep. 2003. 11p. Disponível em: < <http://www.freepatentsonline.com/20030170186.pdf>>. Acesso em 15 jul 2009.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 187–204. 2000.

- PASSICOS, E.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. **Biotechnology Letters**. v. 26, n. 13, p.1073-1076, 2004.
- PATTI, A., PIATELLI, M., NICOLOSI, G. Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-*O*-acylcatechins. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.10, p.577-582, 2000.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PERSSON, M. et al. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**. v.30, p. 916–923, 2002.
- PETERSON, J. J et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19 p.S66–S73, 2006.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID; R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.93, n.1-2, p.67-80, 1998.
- PLOU, F. J. et al. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. **Journal of Biotechnology**. v. 16, p. 55-66, 2002.
- RAZA, S.; FRANSSON, L.; HULT, K. Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. **Protein Science**. v.10, n.2, p.329–338, feb 2001.
- REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.147–148, p. 237–250, 2009.
- RIVA, S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.19-20, p.43-54. 2002.
- RIVA, S.; DANIELI, B.; LUISETTI, M. A Two-Step Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Flavonoid Glycoside Malonates. **Journal of Natural Products**. v.59, n.6, p. 618–621, 1996.
- SALEM, J. H. et al. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. **Process Biochemistry**. v.45, n.3, p.382-389, 2010.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.30, p.513–21, 1958.
- SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 19, n. 8, p.1468-1474, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SMITH, D. A.; JONES, B. C.; WALKER, D. K. Design of Drugs Involving the Concepts and Theories of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. **Medicinal Research Reviews**. v. 16, n. 3, p.243-266, 1996.

SO, F. V. et al. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. **Cancer Letters**. v.112, n.2, p.127-133, 1997.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. v2.

STEVENSON, D. E. et al. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolics acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). **Enzyme and microbial technology**. v.39, p.1236-1241, 2006.

STRAUSS, C. R.; TRAINOR, R. W. Developments in Microwave-Assisted Organic Chemistry. **Australian Journal of Chemistry**. v. 48, n. 10, p. 1665-1692, 1995.

TENG, R. et al. Regioselective acylation of several polyhydroxylated natural compounds by *Candida antarctica* lipase B. **Biocatalysis and Biotransformation**. v.23, n.2, p. 109-116, 2005.

TESTA, B. et al. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. **Perspectives in Drug Discovery and Design**. v.19, p.179–211, 2000.

TORRES, C.F. et al. Lipase-mediated transesterification of menhaden oil with the ethyl ester of conjugated linoleic acid: multi-response kinetics. **Biochemical Engineering Journal**. v. 23, p. 107–116, 2005.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 656p.

TRODLER, P.; PLEISS, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. **BMC Structural Biology**. v.8, n.9, 2008.

UPPENBERG et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**. v. 2, n 4, p.293-308, April 1994.

UPPENBERG et al. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**. v.34, n.51, p. 16838–16851, 1995.

VALIVETY, R. H. et al. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. **Biotechnology and Bioengineering**. v.38, n. 10, p. 1137–1143, December, 1991.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**. v.25, p.515–536, 2007.

VISKUPICOVA, J. et al. Modulating effect of flavonoids and their derivatives on sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase oxidized by hypochloric acid and peroxyntirite. **Neuro endocrinology letters**. v.30, p.148-151, 2009.

VISKUPICOVA, J. et al. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. **Food Chemistry**. v.123, n.1, p.45-50, 2010.

WANG, A. et al. New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.4, n.10, p. 847-856, May, 2010.

WEHTJE, E.; COSTES, D.; ADLERCREUTZ, P. Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 3, n. 5, p. 221-230, August 1997.

WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**. v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

XIAO, Y. et al. Controllable regioselective acylation of rutin catalyzed by enzymes in non-aqueous solvents. **Biotechnology Letters**. v.27, n.20, p.1591-5, Oct 2005.

YANG, H., HENKE, E., BORNSCHEUER, U.T., The use of vinyl esters significantly enhanced enantioselectivities and reaction rates in lipase-catalyzed resolutions of arylaliphatic carboxylic acids. **Journal of Organic Chemistry**. v. 64, p.1709–1712, 1999.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v.223, p. 51–56, 2004.

YOUN, S. H. et al. Lipase-catalyzed acylation of naringin with palmitic acid in highly concentrated homogeneous solutions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 46, n. 1-4, p.26-31, May 2007.

## ANEXO

Valores de área obtidos por CAE-DAD e rendimento proporcional expresso em porcentagem:

<b>Amostra</b>	<b>Área Naringina</b>	<b>Área éster</b>	<b>% Naringina</b>	<b>% Éster</b>
<b>R1 MO 0H</b>	87055793	0	100,0000	0,0000
<b>R1 MO 2H</b>	68683908	1448705	97,9343	2,0657
<b>R1 MO 4H</b>	70155398	1926351	97,3275	2,6725
<b>R1 MO 6H</b>	85482398	2569515	97,0818	2,9182
<b>R1 MO 8H</b>	89471942	2969778	96,7874	3,2126
<b>R1 MO 10H</b>	91799617	3253226	96,5775	3,4225
<b>R1 MO 12H</b>	90446650	3548251	96,2251	3,7749
<b>R2 MO 0H</b>	28712081	0	100,0000	0,0000
<b>R2 MO 2H</b>	26820703	687296	97,5015	2,4985
<b>R2 MO 4H</b>	25478165	672201	97,4295	2,5705
<b>R2 MO 6H</b>	68242743	2244878	96,8152	3,1848
<b>R2 MO 8H</b>	36990944	1354572	96,4675	3,5325
<b>R2 MO 10H</b>	22466183	923485	96,0517	3,9483
<b>R2 MO 12H</b>	46124901	1967045	95,9098	4,0902
<b>R3 MO 0H</b>	71076375	0	100,0000	0,0000
<b>R3 MO 2H</b>	62013400	1492422	97,6499	2,3501
<b>R3 MO 4H</b>	33981601	1040725	97,0284	2,9716
<b>R3 MO 6H</b>	23062271	940330	96,0824	3,9176
<b>R3 MO 8H</b>	19820446	870468	95,7930	4,2070
<b>R3 MO 10H</b>	18262813	1391293	92,9211	7,0789
<b>R3 MO 12H</b>	68230724	2848272	95,9928	4,0072
<b>R4 MO 0H</b>	39645306	0	100,0000	0,0000
<b>R4 MO 2H</b>	58043808	2071350	96,5544	3,4456
<b>R4 MO 4H</b>	41128644	2155942	95,0191	4,9809
<b>R4 MO 6H</b>	47984888	3094638	93,9415	6,0585
<b>R4 MO 8H</b>	61556239	4569256	93,0900	6,9100
<b>R4 MO 10H</b>	22314607	2222724	90,9415	9,0585
<b>R4 MO 12H</b>	78060528	8076439	90,6237	9,3763
<b>R5 MO 0H</b>	86709113	303978	99,6507	0,3493
<b>R5 MO 2H</b>	53627474	1175066	97,8558	2,1442
<b>R5 MO 4H</b>	30238812	1002059	96,7925	3,2075
<b>R5 MO 6H</b>	48770229	2135162	95,8056	4,1944
<b>R5 MO 8H</b>	44858877	2384142	94,9535	5,0465
<b>R5 MO 10H</b>	43610017	3029206	93,5050	6,4950
<b>R5 MO 12H</b>	44055225	3857979	91,9480	8,0520
<b>R6 MO 0H</b>	70175766	0	100,0000	0,0000
<b>R6 MO 2H</b>	27574632	712787	97,4802	2,5198

<b>R6 MO 4H</b>	66173219	3027611	95,6249	4,3751
<b>R6 MO 6H</b>	52282503	2733903	95,0307	4,9693
<b>R6 MO 8H</b>	61323977	3946012	93,9543	6,0457
<b>R6 MO 10H</b>	63132436	4661157	93,1245	6,8755
<b>R6 MO 12H</b>	90953723	9147771	90,8615	9,1385
<b>R1 SK 0H</b>	80402098	0	100,0000	0,0000
<b>R1 SK 2H</b>	59744121	819097	98,6475	1,3525
<b>R1 SK 4H</b>	66507790	1488315	97,8112	2,1888
<b>R1 SK 6H</b>	49532825	1325524	97,3937	2,6063
<b>R1 SK 8H</b>	55553374	1944606	96,6180	3,3820
<b>R1 SK 10H</b>	55567688	2440824	95,7923	4,2077
<b>R1 SK 12H</b>	56163390	2798308	95,2540	4,7460
<b>R1 SK 24H</b>	50283889	4323233	92,0830	7,9170
<b>R1 SK 48H</b>	70702060	11629940	85,8743	14,1257
<b>R1 SK 72H</b>	58264740	12567312	82,2576	17,7424
<b>R1 SK 96H</b>	57177963	13500310	80,8989	19,1011
<b>R1 SK 120H</b>	74988820	23919149	75,8168	24,1832
<b>R2 SK 0H</b>	87581078	0	100,0000	0,0000
<b>R2 SK 2H</b>	78362944	469702	99,4042	0,5958
<b>R2 SK 4H</b>	70975107	1126829	98,4372	1,5628
<b>R2 SK 6H</b>	49532825	1225524	97,5856	2,4144
<b>R2 SK 8H</b>	66737346	2163296	96,8603	3,1397
<b>R2 SK 10H</b>	74207705	3034273	96,0717	3,9283
<b>R2 SK 12H</b>	88860047	5196587	94,4750	5,5250
<b>R2 SK 24H</b>	66057536	5614093	92,1669	7,8331
<b>R2 SK 48H</b>	75022279	12359043	85,8562	14,1438
<b>R2 SK 72H</b>	74956952	18644725	80,0808	19,9192
<b>R2 SK 96H</b>	64534200	17234214	78,9231	21,0769
<b>R2 SK 120H</b>	59230375	18634504	76,0682	23,9318
<b>R3 SK 0H</b>	76307250	0	100,0000	0,0000
<b>R3 SK 2H</b>	71876392	707215	99,0257	0,9743
<b>R3 SK 4H</b>	48381605	999531	97,9759	2,0241
<b>R3 SK 6H</b>	61791964	1860010	97,0778	2,9222
<b>R3 SK 8H</b>	62448970	2488913	96,1672	3,8328
<b>R3 SK 10H</b>	50348556	2572319	95,1393	4,8607
<b>R3 SK 12H</b>	74526903	4191838	94,6749	5,3251
<b>R3 SK 24H</b>	70956599	6590433	91,5014	8,4986
<b>R3 SK 48H</b>	70675597	12794977	84,6713	15,3287
<b>R3 SK 72H</b>	77620401	19492273	79,9282	20,0718
<b>R3 SK 96H</b>	65264236	16825696	79,5033	20,4967
<b>R3 SK 120H</b>	71971811	23024949	75,7624	24,2376
<b>R4 SK 0H</b>	87960129	0	100,0000	0,0000
<b>R4 SK 2H</b>	29576784	854611	97,1917	2,8083
<b>R4 SK 4H</b>	36570062	1799500	95,3101	4,6899
<b>R4 SK 6H</b>	45310570	2764905	94,2488	5,7512
<b>R4 SK 8H</b>	45908427	3353855	93,1918	6,8082

<b>R4 SK 10H</b>	51626172	4411271	92,1280	7,8720
<b>R4 SK 12H</b>	60633070	5731824	91,3632	8,6368
<b>R4 SK 24H</b>	61626634	9125327	87,1024	12,8976
<b>R4 SK 48H</b>	38188665	9634627	79,8537	20,1463
<b>R4 SK 72H</b>	61718609	20229872	75,3139	24,6861
<b>R4 SK 96H</b>	53309889	19114136	73,6080	26,3920
<b>R4 SK 120H</b>	44650604	23497407	65,5200	34,4800
<b>R5 SK 0H</b>	86083069	0	100,0000	0,0000
<b>R5 SK 2H</b>	57464048	671894	98,8443	1,1557
<b>R5 SK 4H</b>	77746522	2500595	96,8839	3,1161
<b>R5 SK 6H</b>	79002678	4255485	94,8888	5,1112
<b>R5 SK 8H</b>	53938211	3692834	93,5923	6,4077
<b>R5 SK 10H</b>	80365725	6002587	93,0500	6,9500
<b>R5 SK 12H</b>	70673361	5536956	92,7346	7,2654
<b>R5 SK 24H</b>	64596797	8584993	88,2689	11,7311
<b>R5 SK 48H</b>	60298905	11870662	83,5517	16,4483
<b>R5 SK 72H</b>	75819731	25381238	74,9200	25,0800
<b>R5 SK 96H</b>	72461189	24821312	74,4853	25,5147
<b>R5 SK 120H</b>	91196310	44385164	67,2631	32,7369
<b>R6 SK 0H</b>	67428137	0	100,0000	0,0000
<b>R6 SK 2H</b>	30986079	358580	98,8560	1,1440
<b>R6 SK 4H</b>	21782645	666231	97,0322	2,9678
<b>R6 SK 6H</b>	76759368	3232899	95,9585	4,0415
<b>R6 SK 8H</b>	43842883	2364672	94,8825	5,1175
<b>R6 SK 10H</b>	52366593	3435287	93,8438	6,1562
<b>R6 SK 12H</b>	60437544	4368354	93,2593	6,7407
<b>R6 SK 24H</b>	57521463	6760751	89,4827	10,5173
<b>R6 SK 48H</b>	45614191	9768708	82,3615	17,6385
<b>R6 SK 72H</b>	68008562	19576023	77,6490	22,3510
<b>R6 SK 96H</b>	54917518	21273419	72,0788	27,9212
<b>R6 SK 120H</b>	15071905	6737216	69,1083	30,8917

Legenda:

**R1, R2 e R3:** reações de esterificação direta (ácido ricinoléico como agente acilante).

**R4, R5 e R6:** reações de transesterificação (óleo de mamona como agente acilante).

**MO:** reação desenvolvida em micro-ondas.

**SK:** reação desenvolvida em shaker.