

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação do Potencial Antioxidante de Produtos de Esterificação de Flavonóides por Lipases

Anete Souza Mecnas¹, Guilherme Alves Silva², Thelma de Barros Machado³, Ana Claudia Amaral⁴, Ivana Correa Ramos Leal², Denise Maria Guimarães Freire¹

¹ Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. anetemecnas@yahoo.com.br

² LaProNEB- Laboratório de Produtos Naturais e Ensaios Biológicos – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Santa Rosa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia Farmacêutica

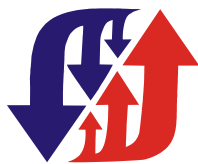
RESUMO

Os flavonóides e os ácidos graxos insaturados atuam na prevenção das doenças cardiovasculares. De acordo com a literatura, a introdução de ácidos graxos de cadeia longa, por meio de reações de esterificação catalisadas por lipases em moléculas de flavonóides é capaz de aumentar significativamente a atividade antioxidante destas moléculas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antioxidante de produtos de esterificação obtidos a partir do flavonóide quercetina e rutina, com ácido oleico, catalisados por lipases comerciais. As reações de esterificação foram conduzidas com os flavonóides: rutina e quercetina em acetonitrila e sem solvente e, o ácido oleico à 60°C, no período de 24 à 120 h, utilizando as enzimas comerciais Novozyme 435, LIPOMOD 34, Lipozyme RMIM, em shaker, foram obtidos produtos com 92 e 89% de conversão para as reações com o flavonóide rutina e quercetina, e que apresentaram um potencial antioxidante (Padrão quercetina: CE50: 30,16 ug/mL e produto de esterificação com a quercetina: CE50: 23,06 ug/mL; Padrão rutina: CE 50 de 27,42 ug/mL e produto de esterificação com a rutina: CE 50 de 8,70 ug/mL) pelo método do DPPH.

Palavras-chave: Atividade antioxidante, esterificação, flavonóides, lipases.

INTRODUÇÃO

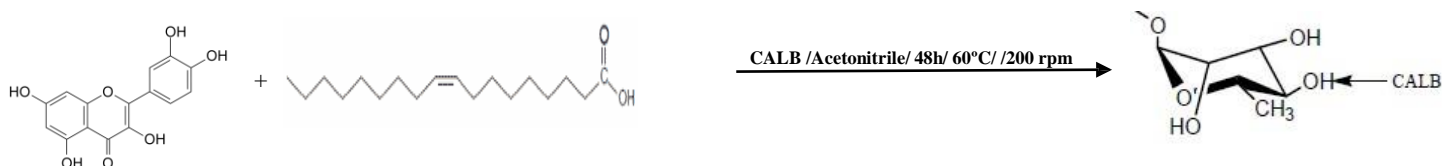
Flavonóides são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Vários estudos demonstraram a atividade antioxidante dos flavonóides e sua inibição na peroxidação de lípidos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), atuando na prevenção das doenças cardiovasculares. Além disso, os ácidos graxos insaturados estão associados a prevenção e tratamento de várias desordens cardiovasculares, tais como trombose e aterosclerose (Voet, 2002). De acordo com a literatura, a introdução de ácidos graxos de cadeia longa por meio de reações de esterificação catalisadas por lipases em moléculas de flavonóides é capaz de aumentar significativamente a atividade antioxidante destas moléculas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antioxidante de produtos de esterificação obtidos a partir do flavonóide quercetina e rutina com ácido oleico catalisados por lipases comerciais.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

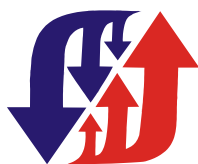
As reações de esterificação foram conduzidas com os flavonóides rutina e quercetina (Sigma-Aldrich) em acetonitrila e, sem solvente, e o ácido oleico à 60° C, nos períodos entre 24 e 24-120h, utilizando as enzimas comerciais Novozyme 435, LIPOMOD 34, Lipozyme RMIM no shaker. A reação de esterificação foi conduzida na proporção de 5 ácido oleico:1 de flavonóide. Segue abaixo um modelo reacional com CAL B (5 mg), Quercetina (15 mg) e ácido oleico (35 mg) (esquema 1). As amostras obtidas após a reação de esterificação foram injetadas no aparelho de CLAE-DAD e no CLAE-EM. O método de Lowry Tinsley também foi utilizado para quantificar o produto de esterificação obtido (Lowry & Tinsley, 1976). Em seguida, as amostras foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante com base nos métodos ORAC (Stockhama, Paimin & Orbell, 2011) e DPPH (Molyneux, 2004). A reação com rutina foi posteriormente otimizada em reator de microondas (60° C, 45 W, por 60 minutos).



Esquema 1. Esterificação catalisada por lipase regioespecífica de quercetina com ácido oleico

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A reação de esterificação com o ácido oleico e quercetina, utilizando o solvente acetonitrila e catalisado pela enzima Novozyme 435, apresentou 89% de conversão em 48 horas (Figura 1). Ao avaliar o potencial antioxidante do produto por DPPH este apresentou CE50 de 23,06 ug/mL, enquanto o padrão quercetina apresentou um CE 50 de 30,16 ug/mL. Pelo método do ORAC a amostra apresentou uma atividade antioxidante melhor que no padrão trolox, em todas as concentrações avaliadas (7,5, 10, 12,5, 15 e 20 ug/mL) (Figura 2). Além disso, a reação com ácido oleico e a quercetina, sem solvente, apresentou 80% de conversão em 96 horas. O produto reacional apresentou uma atividade antioxidante avaliado por DPPH com CE 50 de 37,59 ug/mL. A reação de esterificação do flavonóide rutina com o ácido oleico catalisado pela enzima LIPOMOD 34 apresentou 92% de conversão (Figura 3) em 120 h. A atividade antioxidante do produto avaliado pelo método do DPPH apresentou um CE 50 de 8,70 ug/mL enquanto o padrão rutina apresentou um CE 50 de 27,42 ug/mL. No método do ORAC o produto de esterificação apresentou um potencial antioxidante elevado quando comparado ao padrão trolox nas concentrações: 5, 7,5, 10, 12,5 e 15 ug/mL (Figura 4). O tempo de esterificação desta reação foi otimizado pelo uso do reator de microondas, apresentando 89% de conversão em 60 minutos, e, o produto obtido apresentou um potencial antioxidante promissor quando avaliado pelo método do ORAC (Figura 5). Mellou et al., (2005), observaram que os ésteres de rutina apresentaram maior atividade antioxidante (CE 50 de 0,10 ug/mL) em comparação com a rutina (24,41ug/mL) pelo método do DPPH. Silva et al. (2012) observaram um aumento na atividade antioxidante, pelo método de DPPH, do extrato de chá esterificado (AAO: 5 %) por lipase de *Aspergillus niger* em 72h, em comparação com o extrato do padrão de rutina (AAO: 0,5 %). Esses estudos confirmam o potencial antioxidante de produtos esterificados de flavonóides com ácidos graxos.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

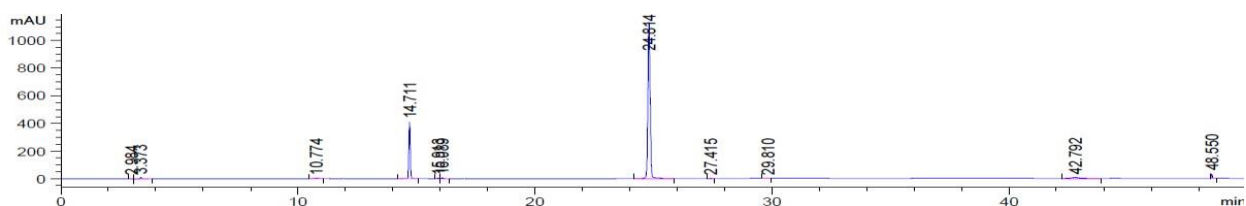


Figura 1. CLAE-DAD da reação de esterificação da quercetina com o ácido oleico catalisado por Novozyme 435 em acetonitrila. O produto de esterificação da quercetina foi eluído no tempo de retenção de 24,8 minutos, sugerindo 89% de conversão (% de área relativa).

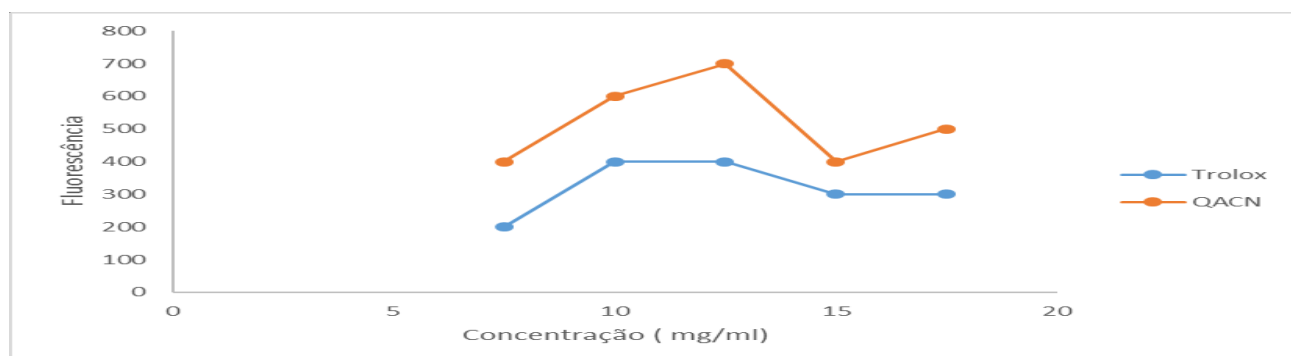


Figura 2. Perfil da atividade antioxidante pelo método do ORAC do produto de esterificação da reação da quercetina com o ácido oleico, obtido por reação em Shaker (60°C, 200 rpm, 48 h) (QACN), em comparação ao padrão Trolox.

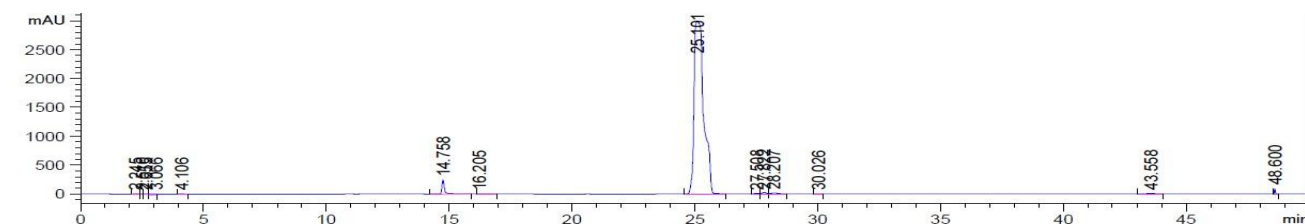


Figura 3. CLAE-DAD da reação de esterificação da rutina com o ácido oleico catalisado por LIPOMOD 34 em acetonitrila. O produto de esterificação da rutina foi eluído no tempo de retenção de 25,10 minutos, sugerindo 92% de conversão (% de área relativa).

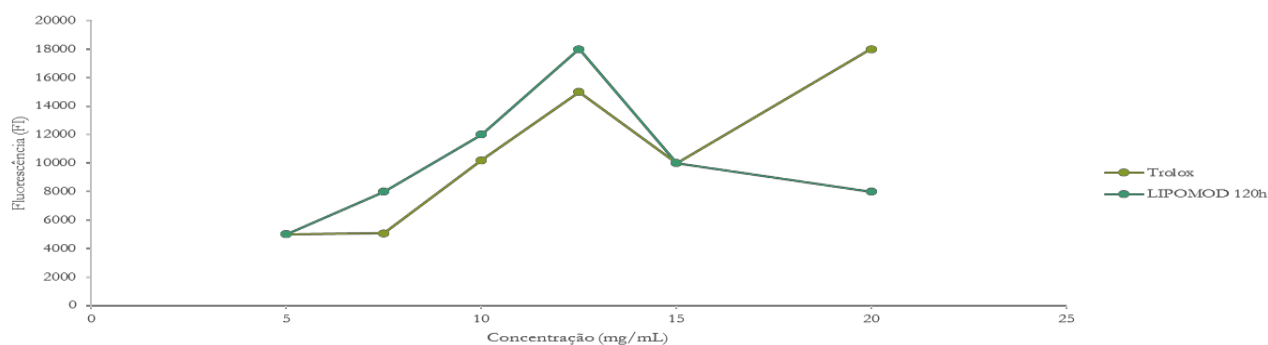
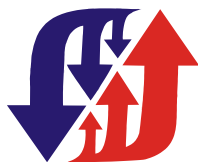


Figura 4. Perfil da atividade antioxidante pelo método do ORAC do produto de esterificação da rutina com ácido oleico, obtido por reação em shaker (60°C, 120h, 200 rpm) (LIPOMOD 120h), em comparação ao padrão Trolox.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

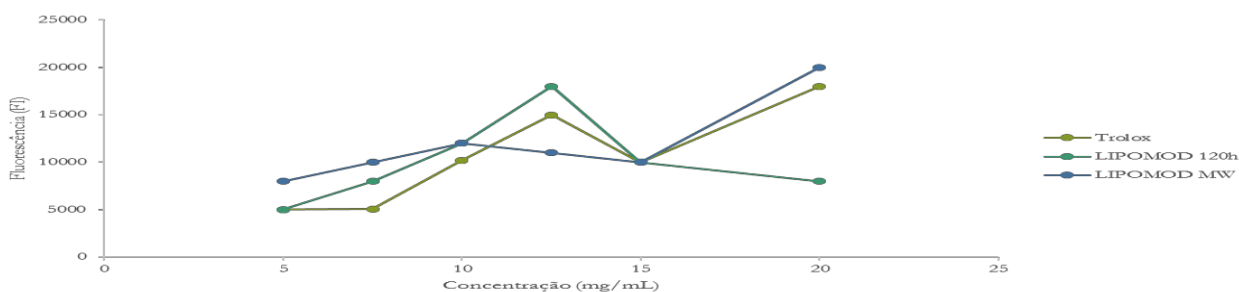
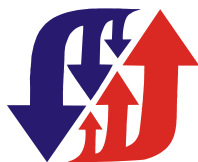


Figura 5. Perfil da atividade antioxidante pelo método do ORAC do produto de esterificação da rutina com ácido oleico, obtido por reação em Shaker (60°C, 120h, 200 rpm) (LIPOMOD120h) e, no micro-ondas, após 60 minutos, à 45w, 60° C (LIPOMOD MW), em comparação ao padrão Trolox.

CONCLUSÕES

Em suma, os produtos de esterificação apresentaram uma conversão acima de 80% e um potencial antioxidante superior em comparação com o padrão de rutina e quercetina, quando avaliados pelo método do DPPH e, em comparação ao Trolox, quando avaliado pelo método do ORAC. Novos ensaios serão realizados com foco nos resultados dos produtos obtidos sem solvente e visando a otimização das reações por sistema de micro-ondas. Serão elucidadas ainda as estruturas químicas dos produtos obtidos, por RMN, a fim de se determinar quais dentre as hidroxilas presentes nos flavonóides ocorreram as reações de esterificação com o ácido oleico, sabendo-se que existem posições e sítios preferenciais pelas lipases.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Electronic Resources

Lowry, R.R., Tinsley, J.I. "Rapid colorimetric determination of free fatty acids". *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 53, p. 470-472, 1976.

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.

Molyneux P.; The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity—Songklanakarin. *Journal of Science and Technology*, 26, 2004, p.211-219.

Silva, C.M.G.; Braga, M.A.; Sobral, V.R.V. Activity assessment in antioxidant vitro of mate tea and green before and after biotransformation in lipase. *Alim. Nutr., Araraquara* v. 23, n. 4, p. 661-669, out./dez. 2012

Stockhama, K.; Paimin, R.; Orbell, J. D.; Adorno, P.; Budhadasa, S.; Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labeling-- *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 2011, p.686–691.

Book

Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. 2002. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed. 931p. 28.