

Maria Conceição Tavares Costa Barros

PREPARAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS FLAVONÓIDES COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e Professor Doutor Saul Campos Pereira da Costa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de mestre em Química Farmacêutica Industrial

Setembro, 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A meus Pais, Irmãos e à minha Sobrinha

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, coordenador do Mestrado e orientador da presente dissertação, pela sugestão do tema do trabalho.

Ao Professor Doutor Saul Campos Pereira da Costa, co-orientador desta dissertação, manifesto o meu sincero reconhecimento pelos ensinamentos ministrados, pelo apoio, pela dedicação, generosidade, compreensão, paciência e sobretudo pela amizade que me dispensou ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor Rui Carvalho pelo contributo prestado na obtenção dos espectros de RMN.

Ao Evandro pelo apoio e palavras de carinho durante o percurso deste trabalho.

À funcionária do Laboratório Graça Ribeiro que, de uma forma ou de outra me apoiou ao longo deste trabalho, deixo aqui expressa a minha gratidão.

“Haja hoje para tanto ontem”

Paulo Leminski

Resumo

Os flavonóides são uma das mais importantes famílias de compostos fenólicos presentes na natureza, não só pela sua abundância no reino vegetal, mas também pelo amplo conjunto de atividades biológicas que lhes têm sido atribuídas. Deste modo, a síntese de novos derivados flavonóides continua a ser alvo de intensas pesquisas, com o intuito de se sintetizarem moléculas com potencial aplicação industrial, nomeadamente para a indústria farmacêutica.

A 3, 3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona (quercetina) pertencente ao grupo dos flavonóis tem vindo a cativar o interesse dos químicos orgânicos devido ao seu grande potencial antioxidante, estando, no entanto, associada a uma escassa biodisponibilidade. Tal razão, tem levado à síntese de moléculas derivadas da quercetina que conservem o mesmo potencial biológico, mas aumentem a sua biodisponibilidade. Contribuir para tornar a molécula da quercetina mais biodisponível, modificando, quimicamente, os diferentes grupos hidroxilo de forma a promover a sua acetilação e desacetilação seletivas, foi o objetivo principal deste trabalho.

Nessa perspectiva, esta dissertação foi dividida em cinco capítulos. Nos dois primeiros é feita uma revisão bibliográfica. No primeiro referem-se os produtos naturais na terapêutica, dando-se especial atenção aos flavonóides. O segundo capítulo versa a ação biológica específica dos flavonóides. No terceiro é feita uma breve revisão sobre o composto em estudo, quercetina, e é estudada a sua modificação química por acetilação e desacetilação seletivas. O quarto capítulo é consagrado às conclusões e, finalmente, no quinto capítulo é descrita a parte experimental.

Palavras-chave: flavonóides, quercetina, biodisponibilidade, acetilação e desacetilação seletivas

Abstract

Flavonoids are one of the most important families of phenolic compounds present in nature, not only because of its abundance in the vegetable kingdom, but also due to the wide range of biological activities that has been attributed to them. Thus, the synthesis of novel flavonoid derivatives remains the subject of intense research, in order to synthesize molecules with potential industrial applications, particularly for the pharmaceutical industry.

Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) has attracted the interest of organic chemists due to its great antioxidant potential, however has been associated to a scarce bioavailability. This reason has led to the synthesis of quercetin derivatives with increased bioavailability and the same biological potential. A contribution to increase the bioavailability of quercetin, by chemical modifications of different hydroxyl groups, through their selective acetylation and deacetylation reactions, was the main objective of this work.

In this perspective, this dissertation is divided into five chapters. In the first, natural products in therapeutics, with particular attention to flavonoids, are referred. The second chapter crosses the specific biological action of flavonoids and in the third, a brief review of the test compound, quercetin, is made, and their chemical modification by selective acetylation and deacetylation reactions was studied. The fourth chapter is devoted to conclusions and, finally, in the fifth chapter the experimental part is described.

Keywords: flavonoids, quercetin, bioavailability, selective acetylation, selective deacetylation

Abreviaturas

Δ	Aquecimento
APT	Do inglês “Attached -Proton -Test”
CCl_4	Tetracloroeto de Carbono
CHCl_3	Clorofórmio
CoA	Co-enzima A
COX_2	Ciclo-oxigenase do tipo II
D	Dupleto
DABCO	1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octano
Dd	Duplo dupleto
DMF	Dimetilformamida
EFAA	Do inglês “European Food Safety Authority”
Eq	Equivalente
Esq	Esquema
FDA	Do inglês “Food and Drug Administration”
Fig	Figura
GABA_A	Receptor GABA tipo A
H	Horas
HIV	Do inglês “Human Immunodeficiency Vírus”
IUPAC	Do inglês “ International Union of Pure and Applied Chemistry”
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LDL	Do inglês “Low-Density Lipoprotein”
lit	Literatura
Min	Minuto
NaCl	Cloroeto de Sódio
ONS	Óxido nítrico sintase
PDGF	Receptor de proteína cinase
Pf	Ponto de fusão
Ppm	Partes por milhão
Rf	Do inglês “Retention factor”
$\text{RMN }^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
$\text{RMN }^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de prótons

RNS	Do inglês “Reactive Oxygen Nitrogen”
ROS	Do inglês “Reactive Oxygen Species”
S	Singuleto
Tab	Tabela
Temp amb	Temperatura ambiente
TGF _{α1}	Receptor de superfície celular
TLC	Do inglês “Thin Layer Chromatography”
UV	Ultravioleta
V _{max}	Velocidade máxima de absorvência
WHO	Do inglês “World Health Organization”
X	Metal-halogéneo
□	Desvio químico
□ _{máx}	Comprimento de onda para os máximos de absorvência

Índice de Figuras

Fig. 1 - Estrutura básica dos flavonóides e numeração recomendada pela IUPAC. (Fonte: Heim et al., 2002).....	3
Fig. 2 - Estrutura base de núcleos das classes dos flavonóides (Fonte: IUPAC, 2012).....	5
Fig. 3 - Estruturas dos compostos mais representativos dos grupos de flavonóides.....	6
Fig. 4 - Quercetina 3-O-Glucósido (15), Quercetina 7-O-Glucósido (16), Quercetina 6-C-Glucósido (17), resultantes da ligação da glucose com a Quercetina (9)	7
Fig. 5 - Estrutura do flavonóide com os grupos de maior relevância para captar os radicais livres	12
Fig. 6 - Pró-fármaco (QC12) -N-Metil-D-sal glucamina, isómero 3`-18; isómero 4`-19	25
Fig. 7 - Quercetina (9) e Morina (20).....	25
Fig. 8 - Quercetina 3-O- (4-trifenilfosfónio-butil)-iodeto (Q3BTPI).....	26

Índice de Tabelas

Tab. 1 - Classe, grupo e compostos representativos de cada grupo de flavonóides.....	5
Tab. 2 - Principais fontes dos diferentes compostos na natureza.....	8
Tab. 3 - Formação das principais espécies reativas de Oxigénio (ROS)	11
Tab. 4 - Condições reacionais estudadas.....	33

Índice de Esquemas

Esq. 1- Biossíntese de flavonóides (Fonte: Andersen & Markham, 2006)	4
Esq. 2 - Mecanismo de doação de hidrogénio e estabilização de radicais pelo grupo catecol.....	13
Esq. 3 - Estabilização dos radicais fenoxilos	13
Esq. 4 - Estabilização de radicais flavonóides e término da reação com a formação de quinona.	14
Esq. 5 - Panorama global das modificações químicas efetuadas	28

Índice Geral

CAPÍTULO 1	1
1. Introdução.....	2
1.1. Produtos naturais na terapêutica	2
1.2. Flavonóides.....	3
1.2.1. Biossíntese e Classificação.....	4
1.2.2. Ocorrência e Distribuição.....	7
CAPÍTULO 2	9
2. Ação biológica/Farmacológica dos flavonóides	10
2.1. Ação antioxidante dos Flavonóides.....	10
2.1.1. Relação estrutura-atividade antioxidante dos flavonóides.....	12
2.1.2. Mecanismo de ação antioxidante	12
2.1.3. Flavonóides e doenças neurodegenerativas.....	14
2.1.4. Flavonóides e doenças cardiovasculares	16
2.1.5. Flavonóides e cancro	17
2.2. Ação anti-inflamatória	19
2.3. Ação anti-hepatotóxica	20
2.4. Ação antidiabética	20
2.5. Ação hormonal	21
2.6. Ação antimicrobiana e antiviral.....	21
2.7. Flavonóides e a sua biodisponibilidade.....	22
CAPÍTULO 3	23
3. Quercetina	24
3.1. Química da quercetina	24
3.2. Relevância farmacológica da quercetina	24
3.3. Modificação química da 3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona (quercetina) por acetilação e desacetilação seletivas.....	27
3.3.1. Preâmbulo.....	27
3.3.2. Síntese da quercetina 3, 3',4',5,7-penta-acetato (21).....	29
3.3.3. Síntese da quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato (22)	31
3.3.4. Desacetilação seletiva da quercetina 3, 3',4',5,7-penta-acetato.....	32
CAPÍTULO 4	39
4. Conclusões	40

CAPÍTULO 5.....	41
5. Parte experimental.....	42
5.1. Reagentes, solventes, sílicas e equipamentos utilizados	42
5.1.1. Reagentes e solventes utilizados	42
5.1.2. Sílicas utilizadas	42
5.1.3. Equipamentos utilizados	42
5.2. Síntese Descritiva	43
5.2.1. Acetilação total da quercetina	43
5.2.2. Acetilação seletiva da quercetina	44
5.2.3. Desacetilação seletiva da quercetina penta-acetato.....	45
Referências Bibliográficas	47

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Produtos naturais na terapêutica

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de agentes terapêuticos na história medicinal. Desde muito cedo o homem se apercebeu das potencialidades dos produtos naturais para a cura de diversas doenças. As tradicionais práticas farmacêuticas deram um enorme contributo aos químicos e farmacologistas para a obtenção de muitos fármacos atualmente empregues (Won, 2006; Butler; Harvey, 2008). Alguns compostos de origem natural tornaram-se medicamentos, enquanto outros foram melhorados sob o ponto de vista farmacológico, ou utilizados como protótipos para a produção de novos fármacos (Newman *et al.*, 2000; Butler, 2004).

A busca incessante dos produtos naturais pelas indústrias farmacêuticas deve-se à grande diversidade molecular que eles apresentam (Turner; Borris, 1996). No entanto, para o desenvolvimento de novos fármacos, existe um desafio, que é de tornar esses princípios ativos naturais num fármaco que seja mais efectivo terapeuticamente (Borris, 1996). Assim, a incorporação dos produtos naturais na terapêutica compreende-se como uma estratégia útil para a obtenção de novos compostos desde que seja realizado um adequado planeamento, ou seja, o isolamento, a identificação em termos químicos, a síntese química e a avaliação das propriedades farmacêuticas do composto puro (Yunes *et al.*, 2001).

Com o desenvolvimento de técnicas modernas que possibilitaram os estudos farmacológicos, bioquímicos, moleculares e toxicológicos, o interesse na procura de novos fármacos ou de protótipos de produtos naturais para obtenção de novos fármacos, aumentou significativamente (Calixto *et al.*, 2001). Hoje, a maioria dos fármacos aprovados pela agência FDA derivaram direta ou indiretamente dos princípios ativos isolados de produtos naturais (Newman *et al.*, 2003; Cragg, 2005; Newman *et al.* 2007; Butler, 2008).

Segundo os estudos feitos por Newman *et al.* (2007), nos últimos 25 anos cerca de 1200 novas substâncias químicas foram lançadas como fármacos, e dessas 48% possuem algum tipo de relação com metabolitos isolados de produtos naturais, seja pela manutenção da totalidade da estrutura ou apenas de um grupo farmacofórico. Butler (2008) evidenciou que só entre 2005 a 2007 foram aprovados trinta fármacos para uso terapêutico e cinco deles representam os

primeiros membros de novas classes de agentes terapêuticos, com mecanismo de ação não descrito anteriormente. Constata-se que houve um aumento significativo de fármacos derivados de produtos naturais principalmente fármacos que atuam no cancro e nas doenças infecciosas.

A organização mundial da saúde (OMS) estima que 80% da população no mundo depende de medicamentos derivados de produtos naturais para os seus cuidados primários e que cerca de 85% desses produtos naturais são derivados de metabolitos secundários de plantas (WHO, 2008).

O contributo que os produtos naturais têm dado à medicina está bastante documentado (Koehn *et al.*, 2005; Cragg & Newman, 2005 ; Paterson *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005 ; Chin *et al.*, 2006 ; Won *et al.*, 2006; Lam, 2007 ; Cragg & Newman, 2007 ; Harvey ; Butler, 2008 ; Mishra *et al.*, 2011; Rey-Ladino *et al.*, 2011; Kinghorn *et al.*, 2011). Entre os produtos naturais estudados e aplicados na terapêutica, destacam-se os flavonóides pelo vasto conjunto de atividades biológicas que lhes têm sido atribuídas (Havsteen, 2002; Machado *et al.*, 2008, Mellou *et al.*, 2005).

1.2. Flavonóides

Os flavonóides são metabolitos secundários pertencentes à classe dos compostos polifenólicos (Harborne *et al.*, 1975; Farnsworth, 1985; Arora *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2000; Harborne & Williams, 2000; Havsteen, 2002; Cárdenas *et al.*, 2006; Andersen & Markham, 2006; Dornas *et al.*, 2007). Quimicamente são caracterizados por compostos de baixo peso molecular (Di Carlo *et al.*, 1999), com uma estrutura comum (Fig.1), contendo quinze átomos de carbonos (**C6-C3-C6**), isto é, apresentam dois núcleos benzénicos ligados a um núcleo heterocíclico. Normalmente designa-se o primeiro núcleo benzénico pela letra **A**, o segundo pela letra **B**, e o terceiro núcleo heterocíclico pela letra **C** (Di Carlo *et al.*, 1999; Heim *et al.*, 2002; Marais *et al.*, 2006; Lin e & Weng, 2006; Martens & Mithöfer, 2005).

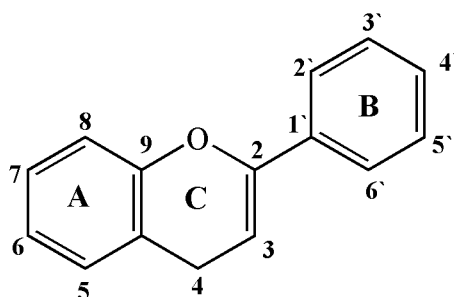
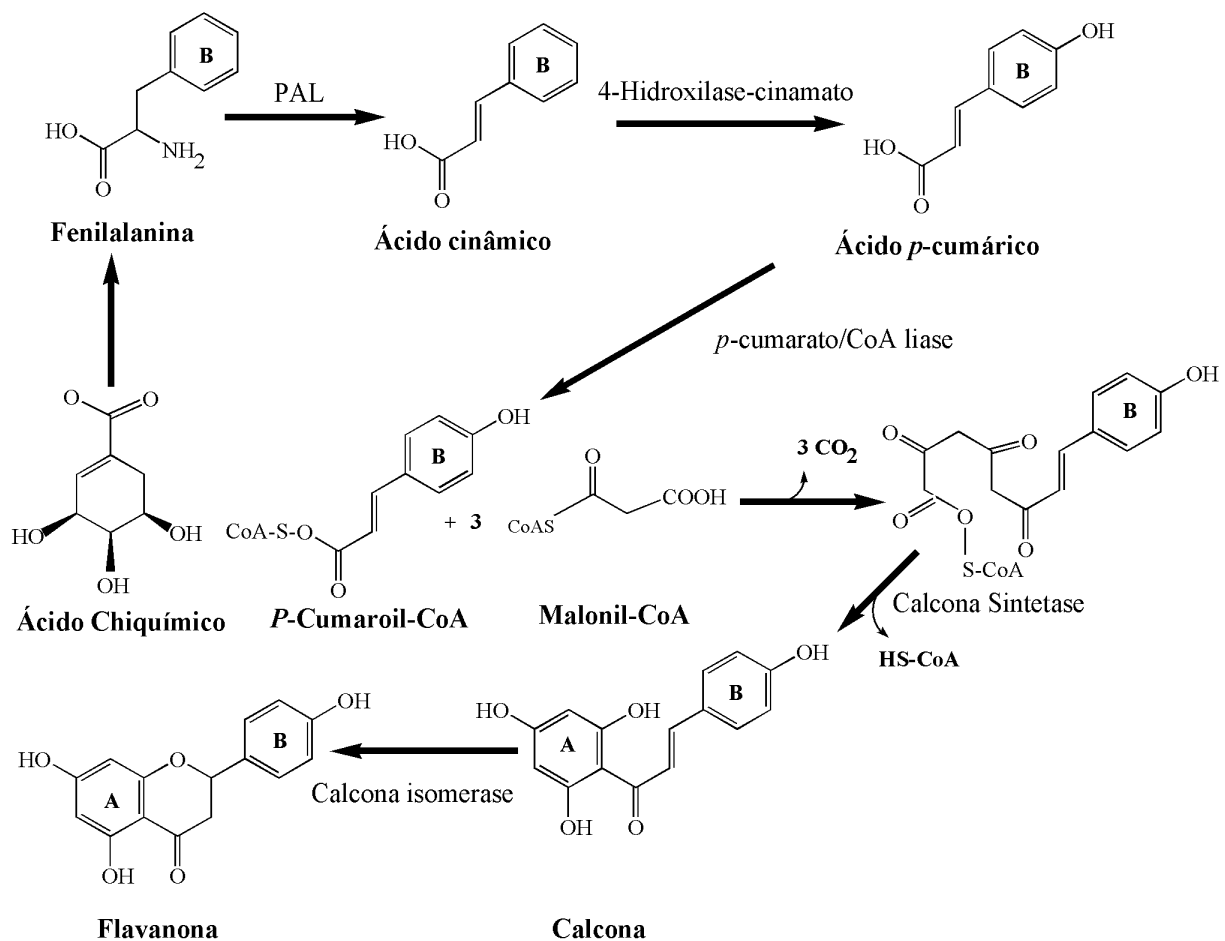


Fig. 1 - Estrutura básica dos flavonóides e numeração recomendada pela IUPAC. (Fonte: Heim *et al.*, 2002)

1.2.1. Biossíntese e Classificação

A estrutura comum dos flavonóides é biossintetizada a partir dos metabolitos derivados do ácido chiquímico e acetil-coA (Esq.1). O ácido chiquímico produz a fanilalanina que é o precursor inicial da síntese dos flavonóides. O aminoácido fanilalanina é desaminado pela enzima fanilalanina-amónia-líase (PAL) e produz o ácido cinâmico. Este é convertido em ácido *p*-cumárico por ação da enzima 4-hidroxilase cinamato. Por conseguinte, ocorre a adição da CoA, catalisada pela enzima *p*-cumarato/CoA liase originando a *p*-cumaroil-CoA. A *p*-cumaroil-CoA, ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a calcona. Esta reação é catalisada pela enzima calcona sintetase. Finalmente, ocorre a ciclização do anel da calcona pela ação da enzima calcona isomerase, originando a flavanona (naringenina), com o núcleo básico de todos os flavonóides. Assim, nos flavonóides, o anel A é formado via acetil CoA, o anel B via ácido chiquímico e o anel C deriva do fosfoenolpiruvato (Formica & Regelson, 1995; Dewick; Havsteen; Ibrahim, 2002; Martens & Mithöfer, 2005; Andersen & Markham 2006; Winkel, 2006; Hurber *et al.*, 2008; Dixon & Pasinetti, 2010).



Esq. 1- Biossíntese de flavonóides (Fonte: Andersen & Markham, 2006)

Conforme a posição da ligação do anel benzênico B ao anel heterocíclico C, os flavonóides podem ser enquadrados em três classes distintas. (Stobiecki & Kachlicki, 2006). Segundo a nomenclatura da IUPAC, os que derivaram de 2-fenilcrom-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirano), são classificados de flavonóides **(1)**, os que derivaram de 3-fenilcromon-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirano) de isoflavonóides **(2)** e os que derivaram de 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirano) de neoflavonóides **(3)** (Marais *et al.*, 2006; Winkel, 2006; Dixon & Pasinetti, 2010; IUPAC, 2012).

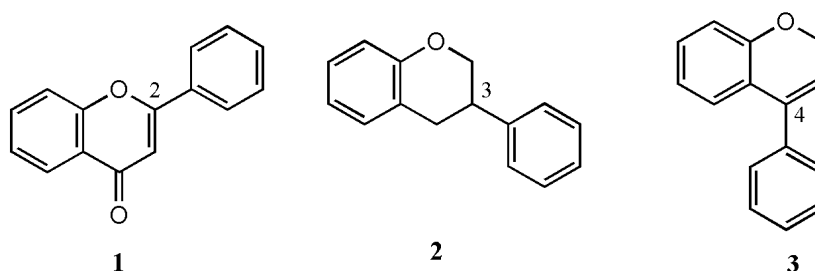


Fig. 2 - Estrutura base de núcleos das classes dos flavonóides (Fonte: IUPAC, 2012)

Dentro de cada classe, de acordo com o grau de oxidação e insaturação do anel C, surgem diferentes grupos de flavonóides (Scalbert & Williamson, 2000; Spencer, 2000; Marais *et al.*, 2006). A tabela 1 indica os nomes dos grupos pertencentes a cada classe e dos compostos mais representativos de cada grupo. A figura 3 ilustra as estruturas dos compostos mais representativos.

Tab. 1 - Classe, grupo e compostos representativos de cada grupo de flavonóides

Classe	Grupo	Compostos representativos
Flavonas	Flavan-3-óis	Catequina (4) , epicatequina (5)
	Flavanonas	Naringenina (6)
	Flavonas	Apigenina (7) , Luteolina (8)
	Flavonóis	Quercetina (9) , Kaempferol (10)
	Antocianinas	Cianidina (11)
Isoflavonóides	Isoflavonas	Genisteína (12) , Daidzeína (13)
Neoflavonóides	Neoflavonas	Neoflaveno (14)

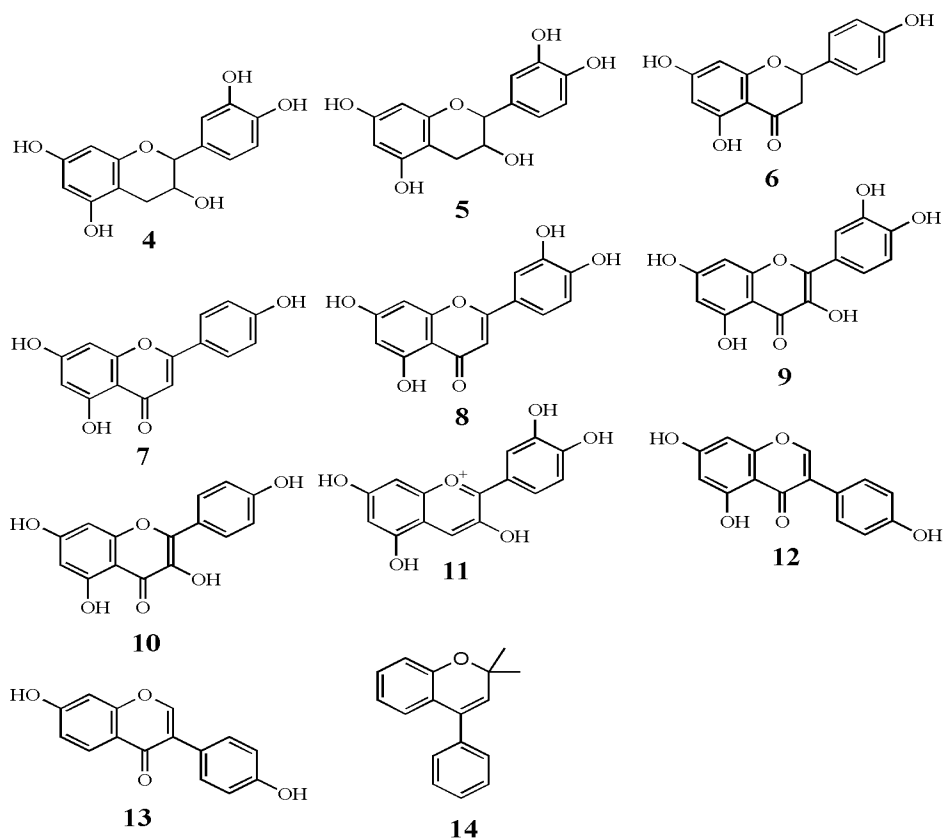


Fig. 3 - Estruturas dos compostos mais representativos dos grupos de flavonóides

Normalmente, vários tipos de substituições ocorrem nessas estruturas, como a hidroxilação, a metilação, a metoxilação, a dimerização, a acilação, e a glicosilação dos grupos hidroxilos (*O*-glicosilações), ou diretamente no núcleo do flavonóide (*C*-glicosilações). Destas substituições as mais frequentes são as hidroxilações e as glicosilações (Winkel, 2006; Hurber *et al.*, 2008). Nas glicosilações, os açúcares mais comuns são a D-glucose e a L-ramnose, porém, pelo menos oito monossacarídeos diferentes ou combinações destes podem ligar-se ao flavonóide. Essas substituições ocorrem na maioria das vezes nos anéis A e B e poucas vezes no anel C, e as posições preferenciais variam com a natureza do grupo do flavonóide em questão, sendo as mais frequentes, no caso dos flavonóis, as posições 3 e 7 para *O*-glicosilações (**15**, **16**) e 6/8 para *C*-glicosilações (**17**) (Havsteen, 2002; Lin *et al.*, 2008).

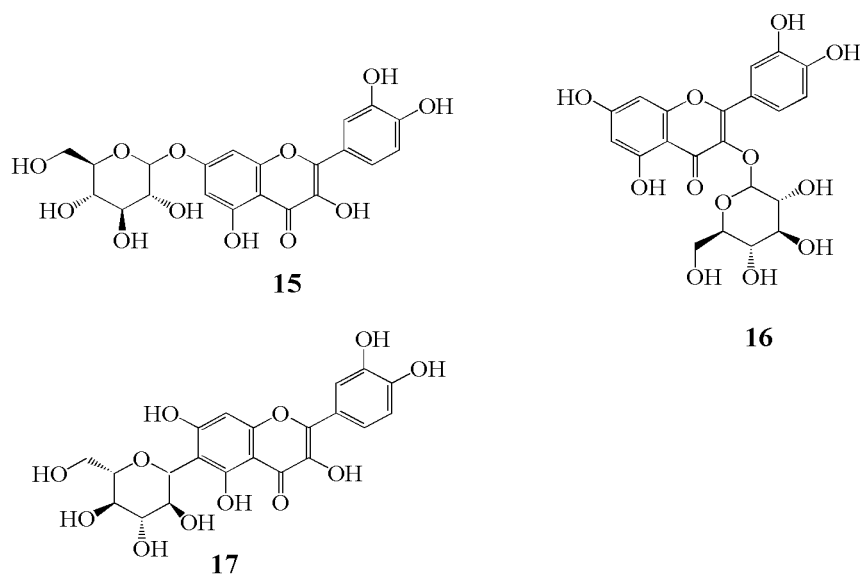


Fig. 4 - Quercetina 3-O-Glucósido (**15**), Quercetina 7-O-Glucósido (**16**), Quercetina 6-C-Glucósido (**17**), resultantes da ligação da glucose com a Quercetina (**9**)

1.2.2. Ocorrência e Distribuição

Os flavonóides têm uma ampla e diversificada distribuição no reino vegetal (Farnsworth, 1985; Arora, 1998; Simões *et al.*, 2000; Harborne *et al.*, 2000; Havsteen, 2002; Cárdenas *et al.*, 2006), com mais de 10.000 derivados identificados (Dixon & Pasinetti, 2010). Isto é justificado com as diferentes modificações e substituições que ocorrem no núcleo do flavonóide (Ellis, 1963). Geralmente encontram-se nas plantas medicinais, nomeadamente na *Ginkgo biloba* L., na *Ruta graveolens* L., no Mirtilo, e em muitos alimentos de origem vegetal (Harbone & Williams, 2000), nomeadamente nas frutas, nas leguminosas, nos chás, no vinho, nas maçãs, no cacau, nas cebolas, na alface e no pimentão verde, (Formica & Regelson, 1995; Rice-Evans, 1996; Lin & Weng, 2006; Hurber *et al.*, 2008), e em mais de 50 diferentes espécies de ervas, abrangendo a *Achillea millefolium* e a *Viola tricolor* (Rice-Evans & Parcker, 2003). Ocorrem como agliconas, mas na maioria das vezes encontram-se ligados a hidratos de carbono formando o *O*-glicosilflavonóide e o *C*-glicosilflavonóide (Andersen & Markham, 2006). Das três classes de flavonóides os neoflavonóides têm uma distribuição bem restrita na natureza, os isoflavonóides têm uma moderada distribuição (Rice-Evans & Packer, 2003) e os flavonóides ampla distribuição (Rice-Evans, 2001; Aron *et al.*, 2008). Entre os grupos de flavonóides, os flavonóis são os que mais predominam, podendo ser encontrados na maioria dos vegetais (Harborne & Williams, 2000; Manach *et al.*, 2005; Lin & Weng, 2006). A tabela 2 mostra as fontes onde são encontrados os diferentes compostos.

Tab. 2 - Principais fontes dos diferentes compostos na natureza

Principais fontes	Compostos
Soja	Genisteína (12) e Daidzeína (13)
Chás, vinho, cacau, chocolate amargo, maçãs	Catequina (4) e Epicatequina (5)
<i>Ginkgo biloba</i> L., <i>Ruta graveolens</i> L., Mirtilo, bróculos, laranjas, maçãs, cebola, chás, mel, pêssegos, peras, ervas, vinho, cacau, chocolate amargo, tangerina, feijão, folhas verdes	Quercetina (9)
Chás, cebola, mel, pêssegos, peras	Kaempferol (10)
Ervas, cereais, tangerina, aipo, salsa, alface, pimentão verde, mel, nozes	Apigenina (7) e luteolina (8)
Vinho, frutos vermelhos, Mirtilo, <i>Ruta graveolens</i> L.	Cianidina (11)
Laranja, tangerina, limão, tomate, hortelã	Naringenina (6)

CAPÍTULO 2

Ação Biológica/Farmacológica dos Flavonóides

2. Ação biológica/Farmacológica dos flavonóides

Os flavonóides são considerados uma das famílias mais importantes dos compostos polifenólicos, não só pela vasta abundância no reino vegetal, mais também pelo conjunto de atividades biológicas que lhes são atribuídas. A abundância dos flavonóides no reino vegetal está relacionada com a sua importante função biológica (Bruneton, 1999). São responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas, protegendo os tecidos contra os danos oxidativos, defendendo-as dos agentes patogénicos como os fungos, as bactérias, os vírus e os raios ultravioletas (Manach *et al.*, 2004). Também são responsáveis pela coloração e sabor de muitos alimentos de origem vegetal como as frutas, o chá e o vinho, e tem um papel importante no controlo hormonal e na inibição enzimática (Rice-Evans & Packer, 2003; Butt & Sultan, 2009; Wheeler, 2004). No organismo humano, os flavonóides atuam em diversas doenças, devido ao seu grande potencial antioxidante (Heim *et al.*, 2002; Havsteen, 2002; Gregor *et al.*, 2005; Athanasellis *et al.*, 2006; Hurber *et al.*, 2008; Crozier *et al.*, 2009; Procházková *et al.* 2011; Gutierrez-Merino *et al.*, 2011).

2.1. Ação antioxidante dos Flavonóides

Durante o funcionamento normal da célula dos organismos aeróbios são constantemente produzidas espécies reativas de oxigénio (ROS). O termo ROS também abrange outras espécies reativas, como espécies reativas de nitrogénio (RNS) e espécies reativas formadas na presença de metais de transição (Fe^{3+} e Cu^{2+}) (Miller *et al.*, 1990; Silva, 2002; Valko *et al.*, 2007). A geração dessas espécies reativas inicia-se com a adição de um electrão ao oxigénio molecular (O_2), originando o anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que também pode ser formado por vários sistemas enzimáticos que incluem a xantina oxidase, a lipo-oxigenase, a ciclo-oxigenase e o citocromo P_{450} (Fridovich, 1999; Gilbert, 2000; Giordano; Madamanchi, 2005; Opara, 2006). Por outro lado o óxido nítrico (NO^{\bullet}) que é considerado o principal RNS ao reagir com o anião superóxido origina o peroxinitrilo (ONOO^-) que é considerado um potente agente oxidante (Carr *et al.*, 2000; Yang & Chen, 2003; Opara, 2006). A adição do segundo electrão e dois hidrogénios ao anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) resulta em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Este, por sua vez reage com metais de transição ($\text{Fe}^{3+} / \text{Cu}^{2+}$) e anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pela reação de *Fenton* e *Haber-Weiss*, respectivamente, originando o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Giordano, 2005; Opara, 2006). Na tabela 3 estão representadas as reações que produzem as principais ROS.

Tab. 3 - Formação das principais espécies reativas de Oxigênio (ROS)

Reação	Produção de ROS
$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$	Formação de anião superóxido
$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow ONOO^-$	Formação de peroxinitrilo
$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	Formação de peróxido de hidrogénio
$Fe^{2+} / Cu^+ + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}/Cu^{2+} + HO^{\bullet} + HO^-$	Reação de <i>Fenton</i>
$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\bullet} + O_2 + HO^-$	Reação de <i>Haber-Weiss</i>

Essas espécies reativas muitas vezes são produzidas para exercer uma função biológica, estando envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e regulação (Fridovich, 1999; Giordano, 2005; Valko, 2007). No entanto, existem casos em que são sub-produtos de processos metabólicos, podendo oxidar lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e causar danos celulares. Embora as células apresentem um sistema enzimático de defesa como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutatona peroxidase (GPH-Px) (Valko *et al.*, 2007), que mantêm as concentrações das ROS equilibradas na presença de outros factores conducentes à geração de espécies reativas (radiação ionizante, radiação ultravioleta, comportamentos alimentares, agentes químicos), pode ocorrer um descontrolo que resulta em stress oxidativo que é considerado o promotor de muitas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancro (Machlin & Bendich, 1987; Cadenas & Packer, 1996; Sies, 1997; Papas, 1999; Scandalios, 2005; Lamuela-Raventos *et al.*, 2005; Mishraa *et al.*, 2006; Valko; Flora, 2007). Os danos causados pelas ROS podem ser impedidos com antioxidantes não enzimáticos entre os quais se destacam os flavonóides (Mates, 1999; Padyatty, 2003; Tinggi, 2008). Os flavonóides têm a capacidade de converter as ROS em espécies menos reativas e remover iões metálicos por complexação (Rice-Evans, 1997; Rice-Evans, 2001; Silva *et al.*, 2002; Havsteen, 2002; Mandel, 2004; Brusselmans, 2005; Andersen & Markham, 2006; Murakami, 2008; Hurber *et al.*, 2008; Musialik *et al.*, 2009). O estudo da relação estrutura-atividade evidenciou essa capacidade dos flavonóides para atuarem como antioxidantes.

2.1.1. Relação estrutura-atividade antioxidante dos flavonóides

A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura química e da orientação relativa das diversas partes da molécula (Heim *et al.*, 2002). Assim, sabe-se que a presença dos grupos hidroxilo nas posições 3' e 4' do anel B e nas posições 7 e 8 do anel A é responsável pela atividade antioxidante da molécula (Heim *et al.*, 2002; Amic' *et al.*, 2003). No entanto, a dupla ligação C2=C3 conjugada com a função cetona no anel C é responsável pelo deslocamento de electrões do anel B e a associação destas duplas ligações com os hidroxilos das posições 3 e 5 também confere atividade antioxidante ao flavonóide (Heim *et al.*, 2002 ; Amic', 2003 ; Michalak, 2006).

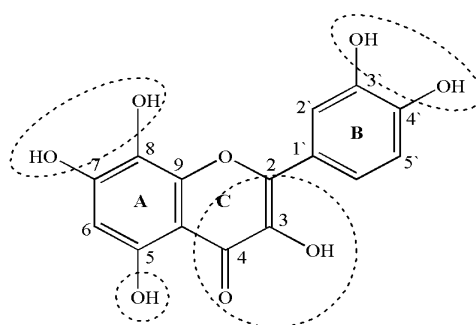


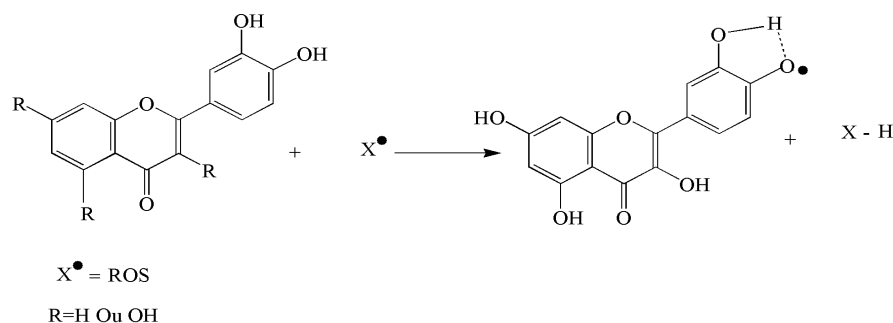
Fig. 5 - Estrutura do flavonóide com os grupos de maior relevância para captar os radicais livres

Contudo, estudos evidenciaram que o potencial de oxidação-redução viabilizado pela presença de grupos substituintes doadores de átomos de hidrogénio para a redução de radicais livres, é mais relevante no grupo catecol do anel B do flavonóide (Silva *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2002). Um estudo feito com a presença e a ausência dos grupos hidroxilos no anel B do flavonóide conferiu que na presença dos dois grupos hidroxilo a alta atividade antioxidante mantêm-se. A perda de um grupo hidroxilo conduz a uma ligeira diminuição da atividade antioxidante, e com a perda dos dois hidroxilos a atividade antioxidante diminui significativamente (Arora *et al.*, 1999).

2.1.2. Mecanismo de ação antioxidante

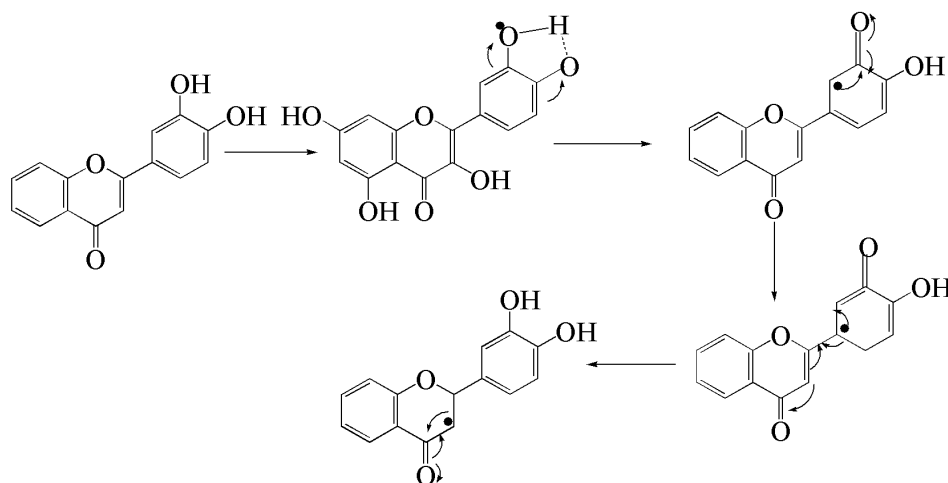
A atividade antioxidante de um composto é determinada pela sua capacidade em doar um átomo de hidrogénio e/ou electrões, e/ou pelo seu potencial em quelar iões de metais de transição e pela capacidade de neutralizar ou estabilizar os radicais livres (Shukla & Gupta, 2010). A atividade antioxidante dos flavonóides assenta fundamentalmente na sua capacidade em doar átomos de hidrogénio, reduzindo os radicais livres às suas formas estáveis e quelar iões metálicos (Fe^{3+} e Cu^{2+}) por complexação (Halliwell, 1992).

Como já foi dito o grupo catecol do anel B desempenha um papel importante na atividade antioxidante ao doar os átomos de hidrogénio (Arora *et al.*, 1999; Fukumoto *et al.*, 2000). A estabilidade dos radicais formados nestas unidades resulta do estabelecimento de interações de hidrogénio entre o grupo hidroxilo e o átomo de oxigénio com um electrão desemparelhado (Esq.5) (Musialik *et al.*, 2009).



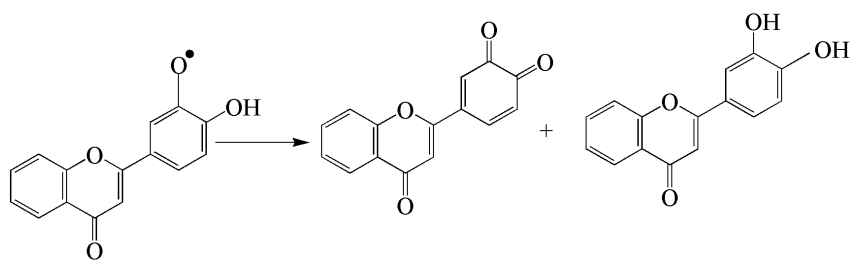
Esq. 2- Mecanismo de doação de hidrogénio e estabilização de radicais pelo grupo catecol

Por outro lado, a insaturação no anel C conjugada com a função cetona na posição 4, possibilita a deslocalização electrónica e estabiliza os radicais resultantes dessa deslocalização, formando radicais fenoxilos que sendo bastantes estáveis impedem a formação e a propagação de novos radicais (Esq.3) (Shukla & Gupta, 2010).



Esq. 3- Estabilização dos radicais fenoxilos

A estabilização dos radicais flavonóides é ainda conseguida de outro modo, através da terminação da reacção radicalar com a formação de quinona (Esq.4) (Shukla & Gupta, 2010).



Esq. 4 - Estabilização de radicais flavonóides e término da reação com a formação de quinona

Outro mecanismo da ação antioxidante dos flavonóides, como já foi referido, é quelar iões metálicos (Fe^{3+} e Cu^{2+}) por complexação. Esta capacidade dos flavonóides está fortemente dependente do arranjo espacial dos grupos hidroxilos, como a presença dos hidroxilos 3 e 5 ou 3' e 4', em conjugação com a dupla ligação $\text{C2}=\text{C3}$, e o grupo carbonilo no anel C da molécula (Jovanovic *et al.*, 1994; Musialik *et al.*, 2009).

As propriedades terapêuticas dos flavonóides associadas à sua ação como antioxidante têm sido extensivamente estudadas (Cai *et al.*, 1997; Rice-Evans, 1997; Rice-Evans, 2001 ; Silva *et al.*, 2002 ; Havsteen, 2002; Mandel, 2004; Brusselmans, 2005; Andersen & Markham, 2006 ; Murakami, 2008; Humber *et al.*, 2008; Musialik *et al.*, 2009). Uma dieta rica em flavonóides, que inclua vários frutos e vegetais (Espín *et al.*, 2007; Côté *et al.*, 2010), sabe-se que é uma dieta rica em antioxidantes (Crozier *et al.*, 2009) e que previne doenças associadas ao stress oxidativo (Stark *et al.*, 2007) tais como: as neurodegenerativas; as cardiovasculares (Morton *et al.*, 2000) e a incidência de alguns tipos de cancro (Ren *et al.*, 2003; Cárdenas *et al.*, 2006; Shukla & Gupta, 2010).

2.1.3. Flavonóides e doenças neurodegenerativas

Com o avanço da tecnologia, o estudo das patologias do cérebro tem ganho cada vez mais importância. O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, devido ao alto consumo de oxigénio e à pouca presença de enzimas antioxidantes, em comparação com outros órgãos (Reiter, 1995; Nunomura *et al.*, 2007; Petrozzi *et al.*, 2007). A oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) está na base do aparecimento de muitas doenças neurodegenerativas (Halliwell, 1992).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças neurodegenerativas afetam até um bilhão de pessoas no mundo e estima-se que 6,8 milhões de pessoas morrem a cada ano em consequência de distúrbios neurológicos (WHO, 2007; Hung *et al.*, 2010). Muitos estudos referem que os flavonóides desempenham um papel importante na proteção do sistema nervoso central

contra a oxidação dos lípidos ou o stress oxidativo prevenindo assim muitas doenças neurodegenerativas.

A evidência epidemiológica sugere que o flavonóide quercetina (9) tem efeitos protetores contra doenças neurodegenerativas. Os mecanismos propostos para estes efeitos são a inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a restauração dos antioxidantes enzimáticos. De acordo com um estudo feito por pesquisadores da Universidade Cornell em Nova York para demonstrar os possíveis efeitos da quercetina sob o desempenho cognitivo de ratos jovens e idosos intoxicados com etanol, a quercetina parece proteger as células de cérebro contra o stress oxidativo, prevenindo assim o Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (Heo & Lee 2004). Segundo Goutman *et al.* (2003) a quercetina modula o receptor GABA_A de uma forma diferente dos benzodiazepínicos, podendo ser utilizada como um agente ansiolítico. Esses resultados confirmam os dados obtidos por Salgueiro *et al.* (1997) que testaram a quercetina em modelos de ratos e evidenciaram o efeito ansiolítico da mesma. Em relação à memória, os mesmos autores também avaliaram os efeitos da quercetina nos testes de esQUIVA inibitória com ratos e verificaram a sua elevada eficácia em baixar os níveis de oxidação. Esses resultados foram confirmados e amplificados por Patil *et al.* (2003) em outros testes de memória. Além disso, os mesmos autores ainda demonstraram que a quercetina inibiu o efeito amnésico induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos (ratos), sugerindo que este efeito é devido à modulação da COX₂ (ciclo-oxigenase tipo 2) e da ONS (óxido nítrico sintase), estando ambas as enzimas envolvidas no processo do aparecimento da doença de Alzheimer. O uso contínuo do neuroléptico haloperidol induz a peroxidação dos lípidos e um decréscimo de enzimas antioxidantes no cérebro humano causando várias desordens neurológicas, entre elas a discinesia orofacial (movimentos repetitivos involuntários). O estudo feito por Naidu *et al.*, (2003) em que induziram o stress oxidativo no cérebro de ratos com o tratamento contínuo de haloperidol causando a discinesia orofacial e de seguida administrado a quercetina, houve uma redução da peroxidação lipídica e a restauração de algumas enzimas antioxidantes. Verificaram assim, que a quercetina desempenhou um papel importante na reversão da discinesia orofacial causada pelo uso contínuo de haloperidol.

Um outro flavonóide que parece atuar em doenças neurodegenerativas é a epicatequina (5). Um estudo *in vitro* revelou que a epicatequina inibe a toxicidade neuronal causada pela oxidação das LDL, podendo ser usada na proteção do cérebro contra os danos causados pelo stress oxidativo (Schroeter *et al.*, 2001).

2.1.4. Flavonóides e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares incluem todas as enfermidades que afetam o coração e os vasos sanguíneos e são uma das principais causas de morte na maioria dos países industrializados. Estima-se que em 2030 quase 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares (WHO, 2011). Estas doenças são conhecidas como multifactoriais.

A reação de espécies reativas de oxigénio com lipoproteínas de baixa densidade está na base do aparecimento de muitas doenças cardiovasculares. Na superfície das LDL há proteínas com importantes ações estruturais e funcionais reconhecidas pelos receptores LDL e que permitem a disponibilização do colesterol sintetizado no fígado a vários tecidos. Sendo elas ricas em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), tais como o ácido linoleico e o araquidónio, são facilmente oxidáveis, dando origem a doenças cardiovasculares (Moura, 2010).

Os flavonóides têm despertado interesse na medicina devido aos efeitos benéficos sobre as doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos demonstram uma correlação inversa entre as doenças cardiovasculares e dietas ricas em flavonóides. Em 1993, um estudo epidemiológico feito com 805 homens de idades compreendidas entre os 65 e os 84 anos, revelou uma relação inversa entre o consumo de flavonóides (ingestão de chá, cebolas e maçãs) e a mortalidade por doença coronária (Hertog *et al.*, 1993). Um estudo realizado entre 1986 e 1998 que incluiu mais de 34.000 mulheres com idades compreendidas entre os 55 e os 69 anos refere que houve uma diminuição do risco de morte causada pelas doenças cardiovasculares devido ao consumo de catequina (4) e epicatequina (5) (Lamuela-Raventos *et al.*, 2005). Os autores atestaram que houve um aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL) e uma diminuição da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e proteção da mesma. Este fato é demonstrado nos estudos realizados por Arai *et al.* (2000) e Silva *et al.* (2002) em que a incidência de aterosclerose baixou devido à proteção das LDL com o consumo de flavonóides. Estudos *in vitro* também revelaram que a catequina e a epicatequina inibem a oxidação das LDL de forma muito significativa (Lamuela-Raventos *et al.*, 2005). Vários estudos relatam a redução da pressão arterial em ratos tratados com a quercetina (9) (Perez-Vizcaino *et al.*, 2010). Os flavonóides captam os radicais livres, e evitam a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que estão na base do aparecimento de doenças cardiovasculares (Tapas, 2008).

2.1.5. Flavonóides e cancro

O cancro é o termo genérico para designar um grande grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo (Singh *et al.*, 2008, WHO, 2012). Uma das principais causas de morte no mundo é causada pelo cancro. Segundo a OMS, em 2008 o cancro foi responsável por 7,6 milhões de mortes, cerca de 13% de todas as mortes (WHO, 2012). Entre 1983 e 2007, houve um aumento significativo dos fármacos derivados de produtos naturais que atuam no cancro (Newman *et al.* 2007) .

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que existe uma relação inversa entre a presença dos flavonóides e o risco de ocorrência de cancro, demonstrando a importância destes compostos na redução e prevenção desta patologia. Estes compostos são particularmente eficientes na inibição das enzimas que catalisam a formação de espécies reativas de oxigénio (ciclo-oxigenase, lipo-oxigenases) e na inibição da enzima ornitina descarboxilase responsável pela síntese de nucleótidos (Hong, 2001). A inibição destas enzimas limita a síntese de DNA e a atividade proliferativa de células carcinogénicas. São também efetivos na inibição de enzimas envolvidas na regulação da proliferação celular como as PTK (proteína tirosina cinases), PCK (proteína C cinases) e PIP₃ (fosfoinositidina 3-cinases) (Manson, 2003). Outro mecanismo envolvido na atividade anticarcinogénica apresentada pelos flavonóides poderá estar relacionado com a indução de apoptose (forma activa de morte celular que desempenha um papel importante na eliminação de células danificadas) (Yang *et al.*, 2001).

O flavonóide quercetina (**9**) tem sido referido como um potente antioxidante no combate ao cancro (Williams, 2004 Materska 2008; Murakami, 2008). Segundo um estudo feito por Weiss (1988), a quercetina, a luteolina (**8**) e a genisteína (**12**) têm capacidade para inibir os danos oxidativos induzidos por radiação ultravioleta em ratos e conseqüentemente inibir o cancro. Segundo Ferguson (2001), certos flavonóides podem influenciar a atividade enzimática envolvida no reparo do DNA ou modular a expressão do gene. De acordo com Machard (2002), os flavonóides afetam a progressão celular, e a quercetina por exemplo, bloqueia o ciclo celular na fase G1/S de células carcinogénicas do colo do útero. A quercetina também bloqueia a fase G2/ M do ciclo celular de células carcinogénicas da mama (Formica & Regelson 1995). A quercetina atua eliminando os radicais livres, inibindo as enzimas carcinogénicas, controlando a proliferação e a morte celular (Gibellini *et al.*, 2011). A apigenina (**7**), a luteolina e a quercetina induzem a apoptose através de mecanismos dependentes do gene P-53 segundo estudos feitos por Shuts (2003). A P-53 é uma proteína funcional que apresenta uma semi-vida curta de 10 a 20 minutos e atua na

regulação do ciclo celular e no reparo do DNA, induzindo a apoptose de células geneticamente instáveis, e conseqüentemente impedindo o aparecimento do cancro. As proteínas cinases regulam e controlam muitas atividades fisiológicas e conseqüentemente interferem no aparecimento e na proliferação do cancro. Segundo Formica & Regelson (1995), a quercetina (9) inibe a proteína tirosina cinase no cancro da mama induzido pelo dimetil-1-2-benzatraceno em ratos. A genisteína também afeta a proteína tirosina cinase nas células do cancro da mama (Ju *et al.*, 2001). O flavonóide naringenina (6) também tem sido pesquisado por possuir a capacidade de inibir as proteínas cinases (Williams, 2004). Zang *et al.* (2005) constataram que a cianidina (11) inibiu a proliferação de células carcinogénicas em diferentes partes do corpo (colo do útero, pulmão, mama, sistema nervoso central). Arts *et al.* (2002) estabeleceram uma relação epidemiológica inversa entre o consumo de catequina (4) e a incidência de cancro rectal em mulheres pós-menopausa. Diversos flavonóides como a epicatequina (5) e a quercetina protegem as células nas vias de sinalização do ciclo celular (Williams, 2004). Outro possível mecanismo de ação dos flavonóides é a interação com as enzimas CYPs, que desempenham um papel importante na ativação ou metabolização de um grande número de agentes carcinogénicos, como os hidrocarbonetos policíclicos e as aminas heterocíclicas. Estudos demonstram uma potente inibição das enzimas do citocromo P-450, em particular as CYP1A1 e CYP1A2, pelos flavonóides (Heim, 2002). O Kaempferol (10), a quercetina e a apigenina demonstraram possuir efeitos inibitórios sobre as CYP1A1, impedindo assim a metabolização dos agentes carcinogénicos e conseqüentemente a reatividade desses compostos com o DNA (Lautrait, 2002). Os flavonóides também atuam na via sintética do ácido úrico, que é responsável por causar danos oxidativos aos tecidos, devido à produção da xantina oxidase. Como já foi referido a xantina oxidase ao reagir com oxigénio molecular, origina anião superóxido, que contém alta reatividade. Segundo Chang (1993), o flavonóide quercetina inibiu a atividade da xantina oxidase, reduzindo assim a produção do radical super-óxido. Também se sugere que os flavonóides podem modular a resposta da glicoproteína-P (enzima responsável pela eliminação de substâncias tóxicas no organismo humano), inibindo a resistência da mesma aos fármacos utilizados no tratamento do cancro (Kitagawa, 2006). A daidzeína (13) possui atividades antiproliferativas sobre o cancro. Isso foi comprovado num estudo feito por Guo *et al.*, (2004), em que as células carcinogénicas do pâncreas do homén foram tratadas com daidzeína. Foram observadas mudanças de comportamento no crescimento das células tratadas com daidzeína, ou seja, um crescimento mais lento em relação às células que não foram tratadas.

Os estudos epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro* muito têm contribuído para a elucidação da relação existente entre o consumo dos flavonóides e a prevenção do cancro. Estudos epidemiológicos em humanos confirmam que um baixo risco de cancro está fortemente associado a dietas ricas em flavonóides e esse efeito é maior do que a toma de suplementos dietéticos com antioxidantes (Lee *et al.*, 2003).

Para além da ação antioxidante, os flavonóides apresentam outras ações biológicas/farmacológicas interessantes, nomeadamente: anti-inflamatórias, anti-hepatotóxicas, antidiabéticas, antimicrobianas, antivirais e hormonais (Rice-Evans *et al.*, 1996; Di Carlo, 1999; Visioli *et al.*; Havsteen, 2002; Lin & Weng 2006.; Marais *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2008; Hurber *et al.*, 2008; Procházková *et al.* 2011; Gutierrez-Merino *et al.*, 2011). No entanto, nos diversos estudos feitos a sua ação como antioxidante é a mais elucidada até agora, e há descrição de que todas as atividades biológicas/ farmacológicas atribuídas aos flavonóides se devem às suas propriedades antioxidantes ou à capacidade de captar radicais livres e metais quelantes causadores de diversas doenças (Bianchi *et al.*, 1999; Machado *et al.*; Hurber *et al.*, 2008).

2.2. Ação anti-inflamatória

O processo inflamatório envolve uma série de mediadores que produzem dor, rubor, edema, calor e a perda da função do órgão comprometido. Os fármacos tradicionais utilizados na inflamação têm apresentado diversos efeitos colaterais, estimulando dessa forma o estudo de novos compostos capazes de atuarem na inflamação. Os flavonóides atuam como anti-inflamatórios e há vários trabalhos na literatura que comprovam este fato. As enzimas ciclo-oxigenases e as lipo-oxigenases estão na base do aparecimento da inflamação. O mecanismo de ação dos flavonóides sobre essas enzimas tem sido extensivamente estudado (Nijveltd, 2001; Fukuda *et al.*, 2003). Os flavonóides atuam nessas enzimas e reduzem a produção do ácido araquidónico, conferindo assim a atividade anti-inflamatória. Flavonóides como a apigenina (7) e a quercetina (9) têm demonstrado possuir ação anti-inflamatória por causarem inibição da ciclo-oxigenase (COX₂) e da sintase do óxido nítrico (ONS) (Mutoh *et al.*, 2000; Raso *et al.*, 2001). Em 1999, Shoskes *et al.*, (1999) identificaram uma redução do quadro inflamatório em homens com prostatite quando tratados com a quercetina. O flavonóide quercetina também tem sido estudado na inflamação do fígado e tecidos adiposos, mas os mecanismos de ação ainda não estão descritos (Dias *et al.*, 2005). Segundo Friesenecker *et al.* (1995), os flavonóides como a luteolina (8) e a quercetina podem diminuir a adesão de células inflamatórias ao endotélio resultando numa

redução da resposta inflamatória. O Kaempferol (**10**) demonstrou uma boa atividade sobre a dermatite induzida com óleo de cróton na orelha de rato (Harbone, 2000) e na inibição da biossíntese de eicosanóides (mediador inflamatório produzido pelo ácido araquidónico) (Larson, 1988).

2.3. Ação anti-hepatotóxica

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. O uso de flavonóides pode impedir ou diminuir doenças hepáticas que estão relacionadas com o excesso de radicais livres de oxigénio. Qi *et al.* (2001) verificaram através de um estudo *in vitro* que a quercetina (**9**) e a genisteína (**12**) têm potencial terapêutico contra a fibrose hepática associando tal mecanismo com a regulação do factor de crescimento das plaquetas PDGF e ações de TGF β ₁. Esses estudos foram confirmados e amplificados por Lee *et al.*, que demonstraram o efeito protetor da quercetina nas células hepáticas quando a fibrose hepática foi induzida pela dimetilnitrosamina em ratos, sugerindo assim, o uso da quercetina na prevenção da fibrose hepática. Outro estudo recente que demonstra a atividade dos flavonóides nas doenças hepáticas foi realizado *in vivo* com a administração do tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos para induzir o dano oxidativo no tecido hepático. Após o tratamento dos ratos com a quercetina houve uma diferença significativa em relação aos ratos que não foram tratados, com uma diminuição considerável de danos oxidativos, aumento de enzimas antioxidantes e uma melhoria na integridade hepática, sugerindo assim que o flavonóide quercetina pode ser um composto promissor na terapia das doenças hepáticas (Bona, 2010).

2.4. Ação antidiabética

As células β -pancreáticas são sensíveis ao stress oxidativo, o que pode contribuir para um mau funcionamento da célula e conseqüentemente a um problema na libertação da insulina (Lapidot *et al.*, 2002). Segundo Ishida *et al.* (2004), a redução ou inibição do stress oxidativo pode preservar as células β -pancreáticas, aumentar a utilização da glucose pelos tecidos periféricos e conseqüentemente controlar os níveis glicémicos. Os flavonóides podem inibir a oxidação das células β -pancreáticas e aumentar o nível das enzimas antioxidantes.

O estudo realizado com ratos diabéticos induzidos por estreptozocina evidenciou a importância do flavonóide quercetina (**9**) em manter os níveis de açúcar controlados. Os autores

sugerem que o composto reduz o açúcar devido à sua propriedade antioxidante que promove a regeneração das ilhotas pancreáticas e conseqüentemente a libertação adequada da insulina (Vessal et al., 2003). Outro estudo realizado por Kim *et al.* (2011) também revelou que a quercetina preveniu os danos oxidativos em ratos diabéticos e aumentou a segregação da insulina. Segundo Braga (2011), a quercetina possui atividade hipoglicêmica em ratas prenhez diabéticas devido à restauração das células β -pancreáticas. Dias *et al.* (2005) & Bona (2010) relataram que a quercetina diminuiu o stress oxidativo em ratos com diabetes mellitus tipo 1. Quine & Raghu (2005) evidenciaram uma diminuição da peroxidação e aumento da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em animais diabéticos ao administrar a epicatequina (5).

2.5. Ação hormonal

Vários flavonóides têm sido pesquisados e os seus mecanismos de ação demonstrados como tendo ação hormonal. Estudos *in vitro* indicam que flavonóides como a daidzeína (13) e a genisteína (12) se ligam ao receptor de estrogénios por apresentarem estruturas químicas similares à hormona estrogénio, podendo exercer um efeito hormonal e anti-hormonal (So, 1997; Fritz, 2002; Cárdenas 2006). A daidzeína e a genisteína podem diminuir os riscos de sintomas pós-menopausa nas mulheres (Kenneth, 1999). Segundo Tapiero *et al.* (2002), os flavonóides com ação hormonal podem produzir uma resposta hormonal normal ou bloquear o sítio de ligação ao receptor (ação antitumoral).

2.6. Ação antimicrobiana e antiviral

Alguns estudos comprovam que os flavonóides atuam nas infecções causadas por bactérias e vírus. Segundo Harbone & Williams (2000) o uso de flavonóides contra a infecção causada por bactérias tem dois objetivos: matar os microrganismos invasores e acabar com os efeitos negativos das suas toxinas. O mecanismo de ação para este efeito ainda não foi explicado. A quercetina (9) demonstrou um efeito significativo contra algumas espécies de bactérias gram-positivas e leveduras bem como inibiu o vírus HIV na ordem dos 80% (Gato *et al.*, 2002). Os flavonóides podem ainda inibir a transcriptase reversa (também conhecida como DNA polimerase RNA-dependente) e controlar as infecções causadas pelos retrovírus (Hirpara *et al.*, 2009).

2.7. Flavonóides e a sua biodisponibilidade

A maioria das atividades biológicas/farmacológicas dos flavonóides foi comprovada *in vitro*. Estudos comprovam que a atividade antioxidante dos flavonóides *in vitro* é muito mais potente do que a atividade antioxidante da vitamina C e E nas mesmas concentrações (Ross, 1998). Por outro lado, um estudo feito por uma equipa de investigação do Instituto Linus Pauling e avaliado pela EFSA refere que no organismo humano a atividade antioxidante dos flavonóides é muito baixa (Ross, 2000; Spector *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2009). Os autores sugerem que isso acontece porque as condições do corpo humano são diferentes das condições *in vitro*, e por isso menos de 5 % dos flavonóides são absorvidos e dessa percentagem a maioria é rapidamente metabolizada e excretada, o que compromete a sua biodisponibilidade e consequentemente a sua ação biológica. Segundo Manach *et al.* (2004), os flavonóides em geral têm uma biodisponibilidade muito baixa e variada, o que contribui para a sua baixa atividade biológica *in vivo*. A baixa biodisponibilidade apresentada pelos flavonóides compromete a sua incorporação em formas farmacêuticas. Uma abordagem para superar a baixa biodisponibilidade dos flavonóides, de modo a explorar a sua atividade *in vivo*, consiste na modificação do composto natural destinada a aumentar a solubilidade e a moderar o metabolismo, mantendo ao mesmo tempo a capacidade da molécula original para se regenerar. Isto suscita uma esperança promissora a nível farmacológico e tem tornado a química dos flavonóides cada vez mais explorada e consequentemente, mais vasta no que diz respeito à síntese de novos derivados, bem como à elucidação de novos e eficientes métodos sintéticos.

CAPÍTULO 3

Quercetina

3. Quercetina

3.1. Química da quercetina

A quercetina assenta a sua capacidade antioxidante em doar electrões/hidrogénios e estabilizar/captar os radicais livres (Rice-Evans, 2001; Havsteen, 2002 ; Musialik *et al.*, 2009). Para isso, conta com uma estrutura química muito particular, com a presença do 3'-OH e 4'-OH *orto* no anel B, uma dupla ligação a C2=C3 conjugada com um carbonilo a C4 e ainda um grupo hidroxilo a C3, no anel C, contando ainda com dois hidroxilos no anel A em posição *meta*, concretamente a C5 e a C7 (Heim *et al.*, 2002; Michalak, 2006; Chen *et al.*, 2010). Apesar de todas essas características serem importantes para a quercetina exercer a sua função como antioxidante, os OH's *orto* do anel B (catecol) têm maior capacidade de sequestrar os radicais livres ou maior propriedade redutora (Metodiewa *et al.*, 1999, Heim *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010). A importância do grupo catecol em captar radicais livres foi confirmada num estudo em que a modificação do grupo catecol com a introdução de um açúcar na posição 4'-OH evidenciou uma baixa capacidade da quercetina para sequestrar radicais livres (Heim *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2010). O 3-OH é um grupo importante na inibição da enzima cinase (Sarno *et al.*, 2002), o 7-OH é responsável pela atividade do desacoplamento fraco da molécula (Van Dijk *et al.*, 2000), e o 5-OH é o menos ácido e mais reativo da molécula devido à ligação intermolecular que o H faz com o grupo carbonilo a C4 (Van Dijk *et al.*, 2000). Quando se encontra ligado ao açúcar, a quercetina apresenta uma menor reatividade em captar os radicais livres, devido ao impedimento estérico da glucose (Bianchi *et al.*, 1999; Fukumoto *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2008). A estabilidade da quercetina depende do anel C da molécula (Michalak, 2006; Moon *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2010). Em condições ácidas é estável e em condições básicas é instável o que leva a fragmentação do anel C da molécula (Moon *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2010).

3.2. Relevância farmacológica da quercetina

Para além de ser o flavonóide mais abundante na natureza, também é aquele a quem mais propriedades farmacológicas têm sido atribuídas, por possuir grande potencial antioxidante (Heim *et al.*, 2002; Michalak, 2006; Chen *et al.*; Alves *et al.*, 2010). As primeiras propriedades farmacológicas da quercetina foram evidenciadas em 1975, quando Rylski *et al.* testaram os efeitos analgésicos de vários flavonóides, e verificaram que a quercetina era a mais efectiva. Nos estudos de ação biológica dos flavonóides evidencia-se que a quercetina é a molécula sobre a qual mais estudos têm sido feitos, e testada a sua ação tanto *in vivo* como *in vitro*, contra vários tipos de doenças.

Um exemplo dos progressos no estudo da quercetina é o pró-fármaco QC12 (**18/19**) com atividade antitumoral que atualmente se encontra numa fase avançada dos estudos clínicos (Mulholland *et al.*, 2001; Hirpara *et al.*, 2009).

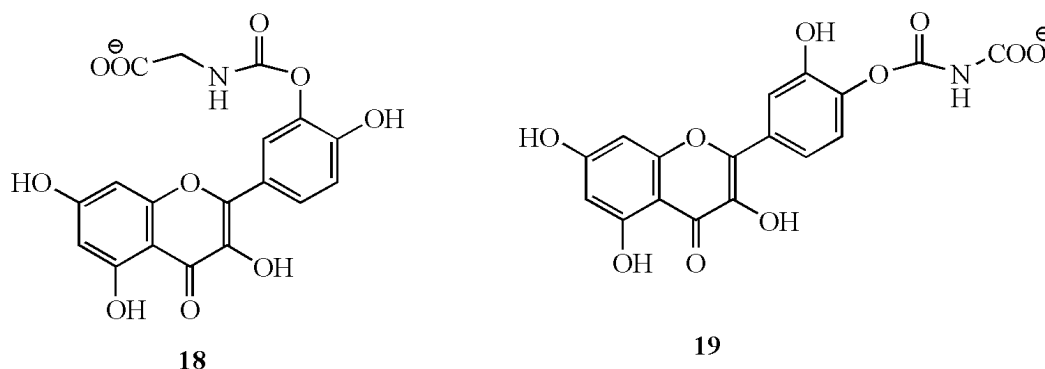


Fig. 6 - Pró-fármaco (QC12) -N-Metil-D-sal glucamina, isómero 3'-**18**; isómero 4'-**19**

Apesar dos vários benefícios farmacológicos da quercetina, a sua atividade *in vivo* é comprometedor devido à sua baixa biodisponibilidade (Manach *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2010; Silberberg *et al.*, 2006; Hollman *et al.*, 1995). A presença de múltiplos OH's torna a quercetina um substrato apto para a fase II do metabolismo, onde é convertida em derivados sulfatados, glucoronidos e éteres metílicos. Alguns estudos feitos com a quercetina revelaram baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral (Manach *et al.*, 1999; Murota *et al.*, 2000, 2003). Hou *et al.* (2003) realizaram um estudo para avaliar as diferenças farmacocinéticas entre a quercetina (**9**) e o flavonóide morina (**20**) nos ratos.

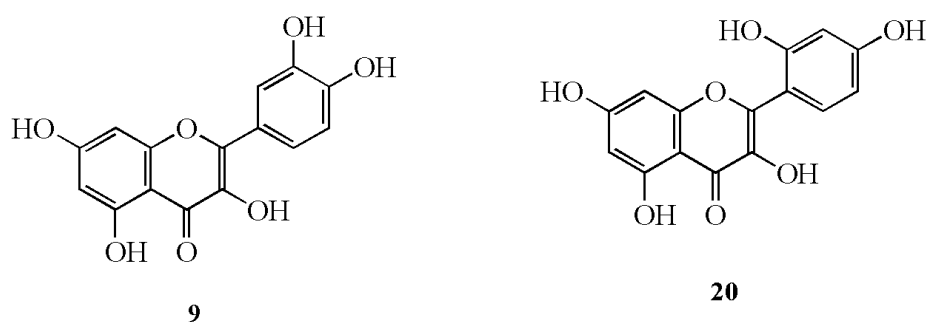


Fig. 7 - Quercetina (**9**) e Morina (**20**)

Os autores encontraram no plasma metabolitos glucoronados e sulfatados da quercetina o que indica a sua rápida metabolização e baixa biodisponibilidade. O estudo referiu ainda que a diferença nos comportamentos farmacocinéticos entre os dois flavonóides se deve à presença dos grupos hidroxilos no anel B do flavonóide quercetina. Há estudos que relatam que a quercetina

tem um efeito modulador sobre as glicoproteínas intestinais, ou seja, quando administrada concomitantemente com outros fármacos, ela influencia a metabolização e conseqüentemente a biodisponibilidade do fármaco. A administração concomitante da quercetina e do imunossupresor ciclosporina em ratos e porcos evidenciou uma considerável redução da concentração plasmática de ciclosporina devido à rápida metabolização do imunossupresor. Os autores sugerem que tal efeito se deve a algum tipo de interação entre a quercetina e as glicoproteínas intestinais (Hsiu *et al.*, 2002).

Por isso, ao longo dos anos têm sido desenvolvidos diversos métodos de síntese de derivados da quercetina com o intuito de aumentar a permanência da molécula no organismo humano e conseqüentemente aumentar a sua biodisponibilidade. O estudo da relação estrutura-atividade da quercetina chega a ser importante no processo de síntese desses novos derivados com atividade farmacológica. A maioria dos estudos tem sido concentrada na proteção dos grupos hidroxilos (Biasutto, 2007; 2009). Mas, outra modificação da molécula tem sido feita através da introdução de substituintes estáveis que conferem melhores propriedades, como por exemplo, a associação do grupo trifenilfosfônico à quercetina na posição 3 (Fig. 7), para produzir derivado mitocondriotópico Q3BTPI (Mattarei *et al.*, 2008, Hoye *et al.*, 2008).

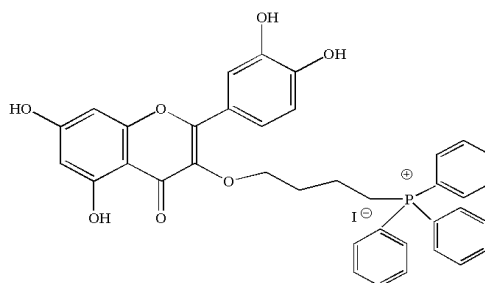


Fig. 8 - Quercetina 3-O- (4-trifenilfosfônio-butil)-iodeto (Q3BTPI)

Em relação aos grupos hidroxilos da molécula, como já foi referido na química da quercetina, não são equivalentes do ponto de vista funcional, o que leva a que a modificação seletiva destes grupos seja muito importante. A esterificação é um ponto de partida para obtenção de moléculas com melhores aplicações farmacológicas. Vários estudos já foram feitos para a modificação seletiva dos grupos hidroxilos, entre eles a acetilação e desacetilação seletivas, principalmente a nível enzimático (Bouktaib, 2002; Montenegro, 2007) por conferir alta selectividade reactiva, no entanto a utilização de métodos químicos para a acetilação e desacetilação seletivas continua a ser um tópico importante e desafiante para os químicos orgânicos.

Sob esse ponto de vista, e tendo em atenção o elevado sucesso que a quercetina apresenta como agente antioxidante, foi nosso objetivo modificar quimicamente a quercetina, com o intuito de estudar a reatividade dos diferentes hidroxilos, contribuindo dessa forma para a criação de derivados mais lipossolúveis e, por conseguinte, com um metabolismo mais moderado e uma maior biodisponibilidade. Para isso estudámos diferentes reagentes, em meio ácido e em meio alcalino, com o intuito de promover a acetilação e a desacetilação seletivas da quercetina.

3.3. Modificação química da 3, 3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona (quercetina) por acetilação e desacetilação seletivas

3.3.1. Preâmbulo

Com este trabalho pretende-se explorar a modificação química da 3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona (quercetina), por acetilação e desacetilação seletivas. Foram abordadas três estratégias distintas, nomeadamente: a acetilação total; a acetilação seletiva e a desacetilação seletiva.

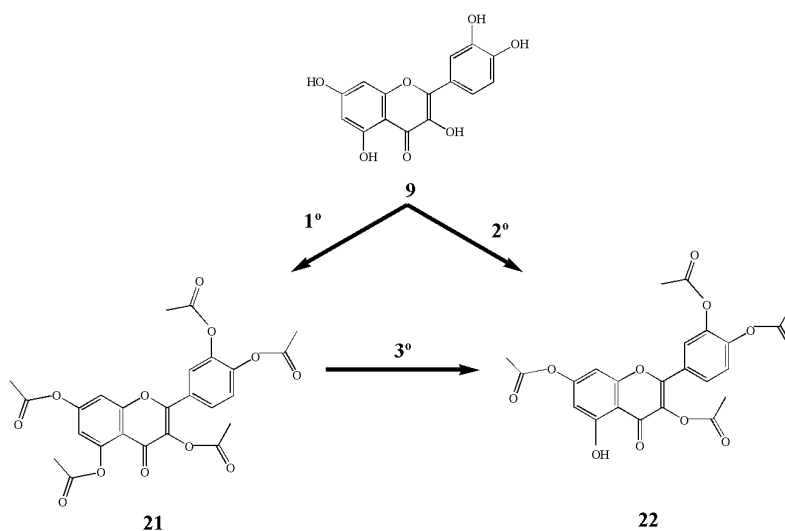
A abordagem inicial consistiu na acetilação total da quercetina recorrendo às condições experimentais descritas na literatura (Mattarei *et al.*, 2010). Uma vez identificada a quercetina penta-acetato, foram feitas várias tentativas de acetilação total recorrendo a reagentes nunca antes utilizados nesta acetilação. Como resultado desse estudo, e pela análise da literatura, foi conseguida a sua acetilação total com recurso a dois “novos” reagentes.

No que diz respeito à acetilação seletiva da quercetina, iniciámos o processo utilizando um procedimento já descrito na literatura (Mattarei *et al.*, 2010), adaptando algumas condições e obteve-se a quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato, tal como descrito. No entanto, um outro procedimento descrito na literatura, e que supostamente levaria à obtenção da quercetina 3,3',4'-tri-acetato (Gusdinar *et al.*, 2011) não foi reproduzível, obtendo-se ao invés, a quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato e a quercetina penta-acetato.

Uma vez que por acetilação seletiva só se conseguiu obter a quercetina 3,3',4',7-tetra-acetato, prosseguimos os nossos estudos no sentido de obter outros derivados hidroxilados, recorrendo à desacetilação seletiva.

Nesse sentido foram testadas diferentes condições reacionais, utilizando como material de partida a quercetina penta-acetato. Na quase totalidade das reações testadas em meio alcalino, com recurso a diferentes reagentes, a reação era incompleta ou prosseguia, invariavelmente, para quercetina.

Tendo em consideração que as condições alcalinas não parecem favorecer a desacetilação seletiva, avançámos no sentido de testar a hidrólise em condições ácidas. As primeiras tentativas feitas em meio ácido pareceram-nos, por TLC, que a reação era mais seletiva, no entanto, após *work-up* verificava-se que na quase totalidade das reações o produto final obtido era a quercetina. Provavelmente, um ácido de Brønsted, na presença de água adequa as condições para um prosseguimento da hidrólise. Numa tentativa de tamponar o processo, ocorreu-nos usar como solvente o ácido acético. Aquando da primeira tentativa de hidrólise nestas condições, utilizando o HClO₄ em meio acetoso verificou-se por TLC, que na reação se obtinha para além do material de partida um segundo produto. No entanto, após *work-up*, para além do produto inicial e do produto da hidrólise visível em TLC, também se isolou uma percentagem relativamente grande de quercetina. Sendo assim, e uma vez que estas condições nos pareceram favoráveis, numa tentativa de amenizar as condições ácidas, testámos a hidrólise recorrendo a ácidos de Lewis, nomeadamente: o triflato de bismuto e o triflato de itérbio. Nestas condições, surpreendentemente, só se formou um produto, a quercetina 3,3',4',7-tetra-acetato.



Esq. 5 -Panorama global das modificações químicas efetuadas

1°

Py, Ac₂O- 20 eq., t.amb., 2h

CH₂Cl₂/ Ac₂O- 20 eq., Bi (OTf)₃-0.2 eq., Δ 2h

CH₂Cl₂/ Ac₂O- 20 eq., DABO- 5eq., t.amb., 2h

2°

CH₂Cl₂/ Py, Ac₂O-1.5 eq., t.amb., 3h

DMF, Ac₂O-1.5 eq., CH₃COONa-2 eq., t.amb, 2h

3°

CH₃COOH/ CH₂Cl₂, Bi (OTf)₃-0.2 eq., Δ 1h

CH₃COOH/ CH₂Cl₂, Yb (OTf)₃-0.2 eq., Δ 3h

3.3.2. Síntese da quercetina 3, 3',4'5,7-penta-acetato (21)

No presente trabalho, procedeu-se à acetilação total da quercetina (**9**) recorrendo a três reagentes distintos. O primeiro, o método tradicional, usa a piridina como solvente/base e como agente acilante o anidrido acético. A monitorização da reação foi feita por TLC usando como eluente a mistura diclorometano/metanol, nas proporções 9.3/0.7. A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante 3 horas. O *work-up* é feito por adição de diclorometano à mistura reacional, sendo depois a solução orgânica lavada com ácido clorídrico diluído, para se tirar o máximo de piridina presente, pela água e seca com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente, obteve-se um crude castanho pálido, que depois de separado em coluna cromatográfica usando uma mistura de acetato de etilo e éter de petróleo (50:50) como eluente, leva à obtenção de um sólido branco correspondente ao composto **21** com um rendimento de 85%.

O outro procedimento utilizou como base o 1,4-diazabicyclo (2.2.2.) octano (DABCO) em substituição da piridina. Este reagente, nunca antes descrito para esta função, permitiu, igualmente, a acetilação completa da quercetina. À quercetina dissolvida em diclorometano, adicionou-se o DABCO e anidrido acético. Deixou-se a reação sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante 2 horas. A monitorização da reação foi feita por TLC nas condições anteriormente descritas. Após *work-up* obteve-se um sólido branco, com uma só mancha cromatográfica e que correspondente ao composto **21**, num rendimento de 82%.

Com a preocupação de se encontrar uma alternativa à piridina e ao DABCO, no âmbito da química verde, foi também testada a possibilidade do triflato de bismuto^(III) servir de catalisador a esta reação. Procedeu-se assim, a uma nova reação para obtenção do composto **21**, utilizando como catalisador o referido ácido de Lewis. Adicionaram-se 0,2 eq de triflato de bismuto^(III) e 20 eq de anidrido acético a uma solução contendo a quercetina dissolvida em diclorometano. A mistura reacional permaneceu a refluxo e sob agitação magnética durante 2 horas. A monitorização da reação foi feita como anteriormente. Após o *work-up*, evaporou-se à secura a solução orgânica, obtendo-se um sólido branco com óptimo aspecto, que não precisou de ser passado numa coluna para a sua purificação, com um rendimento de 69% e que corresponde ao composto **21**. Ficou demonstrado que com a utilização deste método “verde” se obtém um produto com alto grau de pureza.

A elucidação estrutural completa da quercetina penta-acetato (**21**) foi possibilitada através da análise dos espectros unidimensionais (¹H e ¹³C, e APT de ¹³C).

Através da análise do espectro de RMN de ¹H foi possível identificar os sinais mais característicos deste composto:

- ✓ Cinco sinais na forma de singuleto correspondentes aos protões metílicos (OCOCH₃), 3',4' (□2.332 ppm), 5 (□2.340 ppm), 7 (□2.342 ppm), e 3 (□2.433 ppm). O singuleto correspondente à ressonância dos protões metílicos do éster a C-3 surgiu a um desvio químico maior (□2.433) em relação aos outros protões metílicos devido ao efeito mesomérico do grupo carbonilo que faz com que os protões assinalados (OCOCH₃) estejam mais desprotegidos, e portanto, o seu desvio químico é superior.
- ✓ Sinais dos protões H-6, H-8, na forma de duplete com □6.876 e 7.332 ppm, respectivamente, e com a mesma constante de acoplamento de 2.4 Hz. O desvio químico do H-8 é maior em relação ao H-6, devido ao ambiente químico em que o H-8 se encontra, perto do oxigénio do anel heterocíclico. A constante de acoplamento de H-6 e H-8 é igual porque o H-6 acopla com H-8, e o H-8 acopla com o H-6, o que resulta na mesma constante de acoplamento.
- ✓ Sinais dos protões H-5', H-2', na forma de duplete devido ao acoplamento com H-6', com □7.351 e 7.692 ppm e constantes de acoplamento de 8.4 e 2.4 Hz, respectivamente.

✓ Sinais correspondentes ao H-6' na forma de duplete de duplete com δ 7.719 ppm e constante de acoplamento de 8.4 Hz com H-5' e de 2.4 Hz com o H-2'.

A identificação dos carbonos do composto **21** foi feita pelo estudo do espectro de carbono 13 (^{13}C). A identificação inequívoca dos carbonos metílicos C-3, C-3', C-4', C-5, C-7 foi feita recorrendo ao espectro de ^{13}C -APT

Segundo a análise do espectro ultravioleta, os picos de absorção máxima do composto **21**, são a 301 e 252 nm (lit. 290 e 255 nm, Jurd & Rolle, 1958).

3.3.3. Síntese da quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato (**22**)

A Síntese da quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato (**22**) a partir da quercetina (**9**), foi conseguida usando duas vias distintas. A primeira abordagem está descrita na literatura (Mattarei *et al.*, 2010), sendo, no entanto, crucial a otimização do meio reacional para a obtenção do composto pretendido. Com uma segunda abordagem, descrita também na literatura, mas como sendo um método para a obtenção do derivado 3,3',4'- triacetilado (Gusdinar *et al.*, 2011), após várias tentativas para a produção do suposto triacetato, o que se obtinha era sempre o derivado 3, 3',4',7-tetra-acetilado (**22**), bem como a quercetina penta- acetato (**21**).

No primeiro procedimento a quercetina foi dissolvida em diclorometano e piridina e tratada com anidrido acético. A reação manteve-se sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante 2 horas. O composto desejado foi facilmente isolado e purificado por coluna cromatográfica usando como eluente o diclorometano/éter de petróleo/acetato de etilo nas proporções 9:2:1, obtendo-se o composto **22** com um rendimento de 34%. A monitorização da reação foi feita por TLC usando como eluente o tolueno/acetato de etilo/diclorometano, nas proporções de 7:3:1. No segundo procedimento, à mistura constituída pela quercetina e acetato de sódio seco, dissolvida em dimetilformamida, foi adicionado anidrido acético. A mistura ficou a reagir sob agitação magnética e à temperatura ambiente. A monitorização da reação foi feita como anteriormente, evidenciando-se sempre, a formação de dois produtos e a extinção do material de partida. Procedeu-se o *work-up* ao fim de 2 horas. Após o *work-up* e separação em coluna cromatográfica, obteve-se o composto **22** com o rendimento de 56% e o composto **21** com um rendimento de 18%.

3.3.4. Desacetilação seletiva da quercetina 3, 3',4',5,7-penta-acetato

O estudo da desacetilação seletiva foi feito, numa primeira fase, em meio alcalino. Foram testados diversos reagentes/bases e várias condições reacionais. Este estudo, tal como se mencionou no preâmbulo, visava encontrar seletividade química na desacetilação da quercetina penta-acetato.

Com esse propósito foram testadas várias bases, nomeadamente: o imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$), o 1,4-diazabicyclo (2.2.2.) -octano ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o carbonato de potássio (K_2CO_3), a piperazina ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2$), o acetato de sódio tri-hidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e o acetato de sódio anidro (CH_3COONa), e entre todas elas diferentes equivalentes. Testaram-se também diferentes condições reacionais (reação à temperatura ambiente e aquecimento a refluxo).

Na tabela seguinte (Tab. 4) pode ser visto de uma forma sistematizada, o acompanhamento das diferentes condições utilizadas em meio alcalino, com vista à desacetilação seletiva da quercetina penta-acetato.

Tab. 4 - Condições reacionais estudadas

Quercetina acetato	BASE (equivalentes molares)							Solvente	Temperatura (°c)	Tempo de reação (h)	Observação por TLC
	$C_6H_{12}N_2$	$CH_3H_4N_2$	K_2CO_3	$NaHCO_3$	$CH_3COONa.3H_2O$	CH_3COONa	$C_4H_{10}N_2$				
40 mg	17mg (2 eq.)							CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1mL)	Temp.amb.	3h	Um produto de hidrólise parcial e existência de material de partida
40 mg	17 mg (2 eq.)							CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1 mL)	Ebulição (54°c)	3h	Dois produtos de hidrólise parcial e existência de material de partida
40 mg	17 mg (2 eq.)							CH ₃ NO ₂ (5 mL)	Temp.amb.	3h	Um produto de hidrólise parcial e existência de material de partida
40 mg	17 mg (2 eq.)							CH ₃ NO ₂ (5 mL)	Ebulição (70°c)	3h	Dois produtos de hidrólise parcial, extinção de material de partida e progressão com formação da quercetina (9)
40 mg		11mg (2 eq.)						CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1mL)	Tem.amb.	2h	Dois produtos de hidrólise parcial e existência de material de partida
40 mg		11 mg (2 eq.)						CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1mL)	Ebulição (54°c)	3h	Três produtos de hidrólise parcial com Rf's muito próximos e extinção total do material de partida
40 mg			5 mg (0.5eq.)					CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1 mL)	Temp.amb.	4h	Um produto de hidrólise parcial e formação da quercetina
40 mg			5 mg (0.5eq.)					CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1 mL)	Ebulição (54°c)	4h	Um produto de hidrólise parcial e formação da quercetina
50 mg				17 mg (2 eq.)				CH ₂ Cl ₂ (5mL)	Temp.amb.	2h	Hidrólise total/ formação da quercetina
50 mg				17 mg (2 eq.)				CH ₂ Cl ₂ (5mL)	Ebulição (54°c)	1h	Hidrólise total/ formação da quercetina
40 mg					21 mg (2 eq.)			CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1mL)	Temp.amb.	3h	Um produto de Hidrólise parcial, existência de material de partida e quercetina
40 mg					21 mg (2 eq.)			CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1mL)	Ebulição (54°c)	4h	Um produto de hidrólise parcial e existência de material de partida
40 mg						14 mg (2eq.)		CH ₂ Cl ₂ : DMF (1:1 mL)	Temp.amb.	3h	Dois produtos de Hidrólise parcial, extinção de material de partida e formação da quercetina
40 mg						14 mg (2 eq.)		DMF: MeOH (1: 0.05 mL)	Ebulição (54°c)	4h	Dois produtos de Hidrólise parcial, extinção de material de partida e formação da quercetina
40 mg							30 mg (2 eq.)	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1 mL)	Temp.amb.	4h	Um produto de hidrólise parcial, existência de material de partida e formação da quercetina
40 mg							30 mg (2 eq.)	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (5:1 mL)	Ebulição (54°c)	4h	Dois produtos de hidrólise, existência de material de partida e formação da quercetina

A reação que se processou a refluxo e em que se testou o imidazol ($\text{CH}_3\text{H}_4\text{N}_2$), levou à extinção do material de partida e à formação de três produtos, dois com maior Rf que o da quercetina e outro com o mesmo Rf que o composto **9**. Uma vez que o material de partida se extinguiu, procedeu-se ao *work-up* da reação com água e extraiu-se a solução aquosa com acetato de etilo, com o intuito de recuperar os dois produtos resultantes da hidrólise e sujeitá-los posteriormente a uma separação em coluna cromatografia. O sólido amarelo acastanhado obtido foi levado para a coluna, e foi utilizado como o eluente de separação a mistura acetato de etilo/éter de petróleo nas proporções graduais de 30:70, 50:50 e 70:30. O produto começou a sair na proporção 70:30, e verificou-se que havia uma hidrólise total do composto, ou seja a formação da quercetina, o produto indesejado. A insatisfação que surgiu com a hidrólise total do produto, ao ser passado pela coluna cromatográfica, sugeriu um novo método de separação/ purificação. A reação foi repetida e, os produtos obtidos foram sujeitos a uma separação em TLC preparativa, usando como fase móvel diclorometano/metanol nas proporções 9,3:0,7. O resultado obtido não foi satisfatório, uma vez que se verificou afinal que entre as duas manchas que aparecem na TLC, havia mais manchas com Rfs muito próximos e de difícil separação.

As reações testadas, empregando o 1,4-diazabicyclo (2.2.2.) -octano ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2$), feitas a refluxo, levaram à extinção do material de partida e à formação de dois produtos de hidrólise e uma ligeira formação do composto **9**. Neste caso, também se procedeu ao *work-up*, com vista à separação dos produtos obtidos por coluna cromatográfica. No entanto, após o *work-up* fez-se uma TLC e mais uma vez se verificou que os produtos obtidos neste tipo de hidrólise alcalina prosseguiram no sentido da formação exclusiva da quercetina.

A utilização de Carbonato de potássio (K_2CO_3) foi feita tanto à temperatura ambiente como a refluxo. Tal como habitualmente, fez-se a monitorização da reação, e após uma hora, a reação feita a refluxo levou à conversão total da quercetina penta-acetato em quercetina. A que ocorreu à temperatura ambiente não mostrou ser seletiva, formou-se mais do que um produto de hidrólise, o material de partida não se extinguiu, e com o passar do tempo verificava-se também uma progressão no sentido da hidrólise total.

Nas mesmas condições fez-se a reação com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e tanto a reação que ocorreu à temperatura ambiente como a refluxo, ao fim de 2 horas evidenciaram a hidrólise total do composto **21**.

A piperazina ($C_4H_{10}N_2$), outra base testada, tanto à temperatura ambiente como a refluxo, não apresentou seletividade, com realce para a presença do material de partida **21** e progressão para a formação de quercetina.

O acetato de sódio tri-hidratado ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) não evidenciou eficiência. O material de partida não se extinguiu, não houve formação de qualquer produto que correspondesse uma hidrólise seletiva.

Por outro lado, com o uso de acetato de sódio anidro (CH_3COONa), tanto a refluxo como à temperatura ambiente, houve a extinção total do material de partida com a formação de dois produtos resultantes da hidrólise, porém havia uma ligeira progressão no sentido da formação da quercetina.

O término da reação ao fim de um determinado tempo, deve-se ao facto de não haver seletividade e de a reação progredir para a formação de produtos indesejados. Pela análise da literatura, chegou-se à conclusão de que estes resultados se mostraram concordantes com aqueles já obtidos em outras tentativas de desacetilação seletiva usando bases, ou seja, a formação de mais do que um produto, sem extinção total do material de partida e sem seletividade.

Tendo em consideração que as condições alcalinas não parecem favorecer a desacetilação seletiva do composto **21**, avançou-se no sentido de testar a hidrólise em condições ácidas.

A primeira reação testada para a hidrólise seletiva em meio ácido, consistiu no tratamento do composto **21** com ácido perclórico a 0,1 N em diclorometano. A reação manteve-se sob aquecimento a refluxo. Após 30 minutos, por TLC, evidenciaram-se dois produtos e ainda algum material de partida em quantidades residuais. No entanto, alguns minutos depois, antes de se proceder ao *work-up*, verificou-se a formação de um precipitado, que se traduziu na hidrólise total do composto a quercetina.

Provavelmente, um ácido de Brønsted, na presença de água adequa as condições para um prosseguimento da hidrólise. Por isso, numa tentativa de tamponar o processo, ocorreu-nos usar de novo o ácido perclórico 0,1N como reagente promotor da hidrólise, usando, no entanto, como solvente o ácido acético glacial. A mistura reacional manteve-se a refluxo durante 1 h. Fez-se a primeira TLC aos 30 min., tendo revelado o mesmo comportamento que a reação anterior. Deixou-se a mistura reacional a reagir até se extinguir totalmente o material de partida, ou seja, 1,0 h. Após o *work-up*, por TLC, verificou-se a existência de uma terceira mancha que parecia

ser mais um produto de hidrólise seletiva. O crude obtido, de cor amarelo-acastanhada, foi levado para a coluna na tentativa de separar as duas manchas que correspondem aos produtos da hidrólise seletiva. No entanto, não se conseguiu uma boa separação das duas manchas, visto que cada uma delas estava contaminada com a outra. Repetiu-se de novo a reação, alterando apenas os equivalentes do ácido perclórico, para se tentar uma melhor selectividade. Os resultados conseguidos acabaram por ser os mesmos da reação anterior. Dentro da hidrólise seletiva, aparentemente, esta foi a primeira reação em que houve extinção total de material de partida, sem progressão para a hidrólise total. Recorreu-se ainda a uma nova reação, utilizando o Iodeto de zinco a 0.5 eq., em ácido acético glacial. A reação manteve-se sob aquecimento a refluxo durante 3 h. Ocorreu a formação de um produto de hidrólise seletiva, mas o material de partida não se extinguiu.

Levando sempre em consideração a sustentabilidade, meios reacionais mais suaves, com reagentes menos agressivos, decidiu-se testar ácidos de Lewis para a desacetilação/hidrólise seletiva do composto **21**. Nessa perspectiva, testou-se, em primeiro lugar, o triflato de bismuto (III) à temperatura ambiente e a refluxo. Várias horas depois, monitorizando gradualmente a reação, verificou-se que o composto **21** não reagiu. Decidiu-se, então, fazer de novo a reação com o triflato de bismuto^(III) mas, na presença do ácido acético glacial como solvente, com o intuito de tamponizar o meio reacional. A mistura do composto **21** com o triflato de bismuto^(III) (0.2 eq.) e ácido acético glacial foi mantida sob aquecimento a refluxo, na expectativa de acabar todo o material de partida e conseguir o máximo de selectividade possível. Ao fim de 2 horas, por TLC, evidenciou-se a extinção total do material de partida e a formação de um só produto de hidrólise. Após o *work-up*, o crude obtido foi separado por cromatografia de coluna, da qual se isolou um produto puro, identificado espectroscopicamente, como sendo o composto **22**, quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato, num rendimento de 43,4%.

O rendimento mediano desta transformação (43,4%) sugeriu a exploração de um outro ácido de Lewis, o triflato de itérbio^(III). Esta reação alternativa, apesar de ser mais lenta, por ser um ácido de Lewis menos reactivo do que o ácido usado na reação anterior, resultou na obtenção do composto **22** num rendimento de 78%. As condições reacionais mantidas foram as mesmas que as usadas com o triflato de bismuto^(III).

Embora, inicialmente, um dos objetivos deste trabalho fosse a desacetilação seletiva dos diferentes grupos acetato da quercetina penta-acetato, o facto de só se ter conseguido a desacetilação seletiva do acetato a C-5, desmascarando o 5-OH, acabou por se tornar um resultado

importante, porque estes derivados estão a ser utilizados e explorados como agentes mitocondriotrópicos (Mattarei, A. *et al*, 2008). Por isso, consideramos muito interessante este resultado, pela facilidade e seletividade em obter estes derivados a partir da quercetina penta-acetilada.

A elucidação estrutural completa da quercetina 3,3',4',7-tetra-acetato (**22**) foi possibilitada pela análise dos espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C , e APT de ^{13}C) e pelo espectro de infravermelho (IV).

Através da análise do espectro de RMN de ^1H foi possível identificar os sinais mais característicos deste composto:

- ✓ Cinco sinais em forma de singuleto correspondentes aos prótons metílicos (OCOCH_3), 3' ($\square 2.325$ ppm), 4' ($\square 2.333$ ppm), 7 ($\square 2.335$ ppm), e 3 ($\square 2.369$ ppm). O singuleto correspondente à ressonância de prótons metílicos a C-3 surgiu a um desvio químico maior ($\square 2.369$) em relação aos outros prótons metílicos devido ao efeito mesomérico do grupo carbonilo que faz com que o OCOCH_3 a C-3 esteja mais desprotegido, e portanto o seu desvio químico surge a menores frequências.
- ✓ Sinais dos prótons H-6, H-8 na forma de duplete com \square a 6.599 e 6.85 ppm, respectivamente, e com a mesma constante de acoplamento de 1.8 Hz. O desvio químico do H-8 é maior em relação ao H-6, devido ao ambiente químico em que o H-8 se encontra, perto do oxigénio do anel heterocíclico. A constante de acoplamento de H-6 e H-8 é igual porque o H-6 acopla com H-8, e o H-8 acopla com o H-6, o que resulta na mesma constante de acoplamento.
- ✓ Sinais dos prótons H-5', H-6', na forma de duplete com constante de acoplamento 8.4 Hz e $\square 7.36$ e 7.734 ppm respectivamente.
- ✓ Um singuleto correspondente à ressonância do próton H-2' pertencente ao anel B a $\square 7.734$ ppm.
- ✓ Um sinal em forma de singuleto a $\square 12.098$ ppm, correspondente ao H-5.

A identificação dos carbonos do composto **(22)** foi feita pelo estudo do espectro de carbono 13 (^{13}C). A identificação inequívoca dos carbonos metílicos C-3, C-3', C-4', C-5, C-7 foi feita recorrendo ao espectro de ^{13}C -APT.

Através da análise do espectro do infravermelho, os picos máximos de frequência de vibração observados aparecem a: 1184; 1202; 1615; 1650; 1772; 3022; 3084 cm^{-1} .

A análise do espectro ultravioleta permitiu evidenciar que a quercetina 3,3',4',7-tetra-acetato tem uma absorvância máxima aos 256 nm (lit. 253 nm, Jurd & Lurd, 1958).

CAPÍTULO 4

Conclusões

4. Conclusões

- A acetilação total da quercetina foi conseguida, inicialmente, nas condições comuns em que se utilizam como reagentes a piridina e o anidrido acético. O mesmo resultado foi conseguido, quando se substituiu a piridina pelo DABCO e pelo triflato de bismuto^(III). Como resultado desse estudo, e pela análise da literatura, pensamos ser a primeira vez que estes dois reagentes são usados nesta acetilação.
- Por acetilação seletiva só se conseguiu obter a quercetina 3,3',4',7-tetra-acetato.
- No que diz respeito à desacetilação seletiva da quercetina penta-acetato em meio alcalino, na quase totalidade das reações testadas, com recurso a diferentes reagentes, a reação era incompleta ou prosseguia, invariavelmente, para quercetina. As condições alcalinas não parecem favorecer a desacetilação seletiva.
- Em condições ácidas, a presença de água adequa as condições para um prosseguimento da hidrólise no sentido da quercetina. No entanto, quando se usa como solvente o ácido acético glacial e se recorrem a ácidos de Lewis, nomeadamente o triflato de bismuto^(III) e o triflato de itérbio^(III), nestas condições, surpreendentemente, só se forma um produto, a quercetina 3,3',4',7-tetra-acetato. Pensamos que a seletividade inerente à desacetilação na posição 5 se deve à proximidade do grupo carbonilo que faculta a complexação com os ácidos utilizados, tornando, assim, esta posição mais ácida.
- Tendo em atenção a literatura analisada, parece-nos ser a primeira vez que estas condições são descritas para a hidrólise seletiva da quercetina penta-acetato.
- Os derivados da quercetina 5-hidroxilados estão, atualmente, a ser utilizados e explorados como agentes mitocondriotrópicos. Como tal, consideramos muito relevante este resultado, na medida em que estes derivados se podem obter de uma forma acessível e prática a partir da quercetina penta-acetato.

CAPÍTULO 5

Parte experimental

5. Parte experimental

5.1. Reagentes, solventes, sílicas e equipamentos utilizados

5.1.1. Reagentes e solventes utilizados

- Todos os compostos comercialmente disponíveis foram obtidos diretamente do fornecedor Sigma-Aldrich.
- Os solventes utilizados foram fornecidos pela Merck.

5.1.2. Sílicas utilizadas

- O controlo da evolução das reações foi seguido por cromatografia de camada fina (TLC) em placas de alumínio revestidas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck.
- Para a cromatografia em coluna usou-se gel de sílica neutra (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh), da Merck.

5.1.3. Equipamentos utilizados

- Os reagentes foram pesados numa balança AND da A&D company limited.
- Evaporador rotativo Büchi modelo R-114.
- Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro Jasco FT/IR-420.
- Os espectros de ultravioleta (UV) foram obtidos num espectrómetro Jasco V-530.
- Os pontos de fusão (p.f) foram determinados num aparelho Büchi B-540 e não foram corrigidos.
- Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registados em espectrómetro Varian Unity 600 (600 MHz para RMN de ¹H e 150 MHz para RMN de ¹³C), usando

como solvente o CDCl_3 . Os desvios químicos (δ) são dados na escala de ppm e são relativos ao clorofórmio (CHCl_3) usado como referência interna.

5.2. Síntese Descritiva

5.2.1. Acetilação total da quercetina

5.2.1.1. Síntese da quercetina penta-acetato (21)

Procedimento I

A mistura contendo a quercetina (300 mg, 1 eq.), anidrido acético (0.80 mL, 20 eq.) e piridina (7.5 ml) foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente. Ao fim de 3 horas, adicionaram-se 250 ml de diclorometano à mistura reacional. Em seguida, a solução orgânica foi lavada pelo HCl a 10% (3×100 mL), pelo NaOH diluído (3×50 mL), pela água (3×100 ml), seca pelo sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura a pressão reduzida. O crude obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente acetato de etilo/éter de petróleo (50:50), obtendo-se 432 mg ($\text{R}^2 = 85\%$) de um composto cromatograficamente puro, e que corresponde à quercetina penta-acetato **21**. **Ponto de fusão:** 196-198 (lit.194-196, Krueger, 1994). **RMN de ^1H (600 MHz, CHCl_3):** δ 2.332 (6 H, s, 3',4'- OCOCH_3); 2.340 (3 H, s, 5- OOCH_3); 2.342 (3 H, s, 7- OCOCH_3); 2.433 (3H, s, 3- OCOCH_3); 6.876 (1 H, d, $J_{6,8} = 2.4$ Hz, 6-H); 7.332 (1 H, d, $J_{8,6} = 2.4$ Hz, 8-H); 7.351 (1 H, d, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, 5'-H); 7.692 (1 H, d, $J_{2,6} = 2.4$ Hz, 2'-H); 7.719 (1 H, dd, $J_{6,5'} = 8.4$ Hz, $J_{6,2} = 2.4$ Hz, 6'-H) ppm. **RMN de ^{13}C (150 MHz, CHCl_3):** δ 170.05; 169.26; 167.87; 167.82; 167.80; 167.74; 156.83; 154.26; 153.79; 150.37; 144.37; 142.18; 134.02; 127.72; 126.41; 124.00; 123.92; 123.83; 114.73; 113.89; 108.98; 21.15; 21.01; 20.64; 20.49 ppm. **UV:** $\lambda_{\text{máx}}$. 301; 252 nm (CH_3OH); (lit. 290 e 255 nm, Jurd & Rolle, 1958).

Procedimento II

À quercetina (200 mg, 1,0 eq.) dissolvida em diclorometano (5,0 mL), adicionou-se o trifluorometanossulfonato de bismuto (III) (86 mg, 20 mmol, 0.2 eq.) e o anidrido acético (0.8 mL, 20 eq.). A mistura reacional foi mantida a refluxo e sob agitação durante 2 horas. Após este período, adicionou-se água (50 mL). Esta mistura foi extraída pelo diclorometano (2 × 100 mL). De seguida lavou-se a fase orgânica com uma solução de NaHCO_3 sat. (2 × 50 mL), com o NaOH a 10% (2 × 50 mL), com a água (3 × 100 mL), secou-se pelo sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à secura a pressão reduzida. Obtiveram-se 236 mg de um sólido branco

puro ($\epsilon=69\%$), correspondente ao composto **21**. Os dados da análise do composto são coincidentes com os obtidos no procedimento I.

Procedimento III

À quercetina (200 mg, 1,0 eq.) dissolvida em diclorometano (5,0 mL), adicionou-se o 1,4-diazabicyclo [2.2.2] -octano (371 mg, 5,0 eq) e o anidrido acético (0.8 mL, 20,0 eq.). Manteve-se a mistura reacional à temperatura ambiente sob agitação magnética durante 2 horas. Esta mistura foi extraída pelo diclorometano (2×100 mL). De seguida lavou-se a fase orgânica com uma solução de NaHCO_3 sat. (2×50 mL), com o NaOH a 10% (2×50 mL), com a água (3×100 mL), secou-se pelo sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à secura a pressão reduzida. Obtiveram-se 280 mg de um sólido branco puro ($\epsilon=82\%$), correspondente ao composto **21**. Os dados da análise do composto são coincidentes com os obtidos no composto do procedimento anterior.

5.2.2. Acetilação seletiva da quercetina

5.2.2.1- Síntese da quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato (**22**)

Procedimento I

À quercetina (300,0 mg) dissolvida em diclorometano (6,0 mL) e piridina (1.5 mL), adicionou-se gota-a-gota o anidrido acético (0.42 mL, 15.0 mmol, 5.0 eq.). A mistura reacional permaneceu em agitação magnética e à temperatura ambiente durante 3 horas. De seguida esta mistura foi extraída pelo diclorometano (50 mL), lavado com HCl (3×50 mL), seca pelo sulfato de sódio anidro (NaSO_4), filtrada e evaporada à secura a pressão reduzida. Purificou-se o resíduo obtido numa coluna cromatográfica usando como eluente diclorometano/éter de petróleo/acetato de etilo (9: 2: 1), obtendo-se 466 mg do composto **22** ($\epsilon=34\%$). **Ponto de fusão:** 169-172. **IV (Filme/NaCl): RMN de ^1H (600 MHz, CHCl_3):** $\epsilon=$ 2.325 (3 H, s, 3'- OCOCH_3); 2.333 (3 H, s, 4'- OCOCH_3); 2.335 (3 H, s, 7'- OCOCH_3); 2.369 (3H, s, 3- OCOCH_3); 6.599 (1 H, d, $J_{6,8}=1.8$ Hz, 6-H); 6.85 (1 H, d, $J_{8,6}=1.8$ Hz, 8-H); 7.36 (1 H, d, $J_{5',6'}=8.4$ Hz, 5'-H); 7.734 (1 H, s, 2'-H); 7.75 (1 H, d, $J_{6',5'}=8.4$ Hz, 6'-H); 12.09 (1 H, s, 5-H) ppm. **RMN de ^{13}C (150 MHz, CHCl_3):** $\epsilon=$ 176.23; 168.3; 168.15; 167.79; 167.70;161.67; 156.33; 155.90; 155.53; 144.62; 142.22; 132.17; 127.50; 126.51; 123.99; 108.76; 105.51; 101.15; 21.16; 20.65; 20.64; 20.38 ppm. **IV (Filme/NaCl): Vmax.** 1184.08; 1202.4;1615.09; 1650.77; 1772.26; 3022.87; 3084.58. **UV:** $\epsilon_{\text{máx.}}$ 256 nm (CH_3OH); (lit. 253 nm, Jurd & Rolle, 1958).

Procedimento II

À quercetina (200,0 mg) dissolvida em dimetilformamida (1,0 mL), adicionou-se o acetato de sódio seco (98,0 mg, 20,0 mmol) e anidrido acético (0,071 mL, 12,0 mmol). A mistura permaneceu em agitação magnética a 0 °C durante 2 horas. Após este período adicionou-se 5,0 mL de uma solução saturada contendo cloreto de sódio (NaCl) e extraiu-se a fase orgânica pelo acetato de etilo (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com água (2×), seca com sulfato de sódio anidro (NaSO₄), filtrada e evaporada à securo a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado e separado numa coluna cromatográfica, usando como eluente a mistura diclorometano/éter de petróleo/ acetato de etilo (9: 2: 1), obtendo-se 174.6 mg de composto **22** (ϕ=56%) e 49.7 mg do composto **21** (ϕ=18%).

5.2.3. Desacetilação seletiva da quercetina penta-acetato

5.2.3.1- Síntese da quercetina 3, 3',4',7-tetra-acetato (22)

Procedimento I

À quercetina penta-acetato (100,0 mg, 1,0 eq.) e trifluorometanosulfonato de bismuto^(III) (26 mg, 20,0 mmol, 2,0 eq.), dissolvidos em diclorometano (10,0 mL), adicionou-se o ácido acético glacial (3,9 mL). Manteve-se a mistura reacional em refluxo a 65 °C durante 2 horas. Após este período adicionou-se água (50mL) e procedeu-se à extração pelo diclorometano (2×100mL). De seguida lavou-se a fase orgânica com uma solução de NaHCO₃ sat. (2 × 50 mL) e água (2×50 mL), secou-se pelo sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à securo a pressão reduzida. Purificou-se o resíduo obtido em coluna cromatográfica de sílica gel, usando como eluente a mistura de diclorometano/éter de petróleo/ acetato de etilo (9:1:1), obtendo-se 92 mg do composto **22** (ϕ= 43,4%).

Procedimento II

À quercetina penta-acetato (30,0 mg, 1,0 eq.) e trifluorometanosulfonato de itérbio^(III) (7.3 mg, 20,0 mmol, 2,0 eq.), dissolvidos em diclorometano (4,0 mL), adicionou-se o ácido acético glacial (1,0 mL). Manteve-se a mistura reacional em refluxo a 65 °C durante 5 horas. Após este período adicionou-se água (50mL) e procedeu-se à extração pelo diclorometano (2×100mL). De seguida lavou-se a fase orgânica com uma solução de NaHCO₃ sat. (2 × 50 mL) e água (2×50 mL), secou-se pelo sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à securo a pressão reduzida. Purificou-se o resíduo obtido em coluna cromatográfica de sílica gel, usando como eluente a mistura de diclorometano/éter de petróleo/ acetato de etilo (9:1:1), obtendo-se 43,6 mg do composto **22** (□= 78%).

Referências Bibliográficas

1. Amić, D.; Davindović-Amić, D. D.; Beslo, D.; Trinajstić, N.; Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids, *Croat. Chem. Acta, Zagreb*, v.76, n° 1, p.55-61, **2003**.
2. Andersen, Ø. M.; Markham, K. R.; Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, *Taylor & Francis*, Nova York, **2006**.
3. Arai, Y. *et al.*; Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration, *J. Nutr.*, v.130, p.2243-2250, **2000**.
4. Aron, P. M.; Kennedy, J. A.; Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity, *Mol. Nutr. Food Res.*, p.52-79, **2008**.
5. Arora, A.; Nair, M. G.; Strasburg, G.M.; Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system, *Free Radical Biol Med*, 24:1355-63, **1998**.
6. Arts, I. C.; Jacobs, D. R. J.; Gross, M.; Harnack, L. J.; Folsom, A. R.; Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: *the Iowa Women's Health Study*, United States, 13, p.373-382, **2002**.
7. Athanasellis, G.; Melagraki, G.; Afantitis, A.; Makridima, K.; Igglessi-Markopoulou, O.; A simple synthesis of functionalized 2-amino-3-cyano-4-chromones by application of the N-hydroxybenzotriazole methodology, *Arkivoc*, p.10-28, **2006**.
8. Behling, E. B., *et al.*; Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas, *Alimentos e Nutrição*, v.15, n.3, p.285-292, **2004**.
9. Bianchi, M. L. P.; Antunes, L.M.G.; Free radicals and the main dietary antioxidants, *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(2): p.123-130, **1999**.
10. Biasutto, L.; Marotta, E.; De Marchi, U.; Zoratti, M.; Paradisi, C.; Ester-based precursors to increase the bioavailability of quercetin, *J. Med. Chem*, 50, p.241-253, **2007**.

11. Biasutto, L.; Marotta, E.; Mattarei, A.; Beltramello, S.; Caliceti, P.; Salmaso, S.; Bernkop-Schnurch, A.; Garbisa, S.; Zoratti, M.; Paradisi, C.; Absorption and metabolism of resveratrol carboxyesters and methanesulfonate by explanted rat intestinal segments, *Cell.Physiol.Biochem.*, 24, 557-566, **2009**.
12. Bona, S.; Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos, *Dissertação*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2010**.
13. Boots, A.W.; Haenen, G. R.; Bast, A.; Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical, *Eur. J. Pharmacol.*, 585, p.325-337, **2008**.
14. Borris, R. P.; Natural Products research: perspectives from a major pharmaceutical company, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 29-38, **1996**.
15. Bouktaib, M.; Lebrun, S.; Atmani, A.; Rolando, C. Hemisynthesis of all the Omonomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions, *Tetrahedron*, 58, **2002**.
16. Braga, C. P; Avaliação metabólica de ratas prenhez diabéticas tratadas com flavonóide quercetina e repercursões na prole, *Dissertação*, Botucatu-SP, **2011**.
17. Bruneton, J.; Pharmacognosy-Phytochemistry Medicinal Plants, 2^a ed., *Lavoisier Publishing*, Paris, **1999**.
18. Brusselmans, K.; Vrolix, R.; Verhoeven, G.; Swinnen, J.V.; *J. Biol. Chem.*, 280, 5636-5641, **2005**.
19. Butler, M. S.; The role of natural product in chemistry in drug discovery, *J. Nat. Prod.*, 67, 2141-2153, **2004**.
20. Butler; M. S.; Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials, *Nat. Prod. Rep.*, 25:475-516, **2008**.
21. Butt, M. S.; Sultan, M. T.; Green tea: nature's defense against malignancies, *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 49, 463, **2009**.
22. Padyatty, S. J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J. H.; *Journal of the American college of Nutrition*, 22, p.18-25, **2003**.

23. Cai, Q.; Rahn, R. O.; Zhang, R.; Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals, *Cancer Letters* 19 , p.99-107; **1997**.
24. Cadenas, E.; Packer, L., Handbook of Antioxidants, 2^a ed., *Marcel Dekker*, Nova Iorque, **1996**.
25. Calixto, J. B. Schidt, C.; Otuk, M. F.; Santos, A. R. S.; Biological activity of plants extractes: Novel analgesic durgs, *Expert opinion Emerging drugs*, v.6 no.2, p-261-279, **2001**.
26. Cárdenas, M.; Marder, M.; Blank, V.C. ; Roguin, L.P.; Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines, Instituto de Química y Físicoquímica (UBA-CONICET), Facultad de Farmácia y Bioquímica, *Biorganic & Medicinal Chemistry* 2966-2971, **2006**.
27. Carr, A. C.; McCall, M. R., Frei, B.; Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20:1716-23, **2000**.
28. Chang, W. S., Lee, Y. J.; Lu, F.J., Chiang, H.C.; Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase, *Anticacer Res*: 13, 2165-70, **1993**.
29. Chen, C.; Zhou, J.; Ji, C.; Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance, *Life Sciences* 87, 333-338, **2010**.
30. Côté, J.; Caillet, S.; Doyon, G. ; Sylvain ; J.-F.; Lacroix, M.; Bioactive compounds in cranberries and their biological properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 50, 666, **2010**.
31. Cragg, G. M.; Newman, D.J.; Biodiversity: A continuing source of novel drug leads, *Pure Appl. Chem.*, 77, 7-24, **2005**.
32. Crozier, A.; Jaganath I. B.; Clifford, M. N.; Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Rep.* 26, 1001, **2009**.
33. Dewick, P. M.; Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2^a ed. *John Wiley*, Chichester, **2002**.

34. Di Carlo, G.; Mascolo, N., Izzo, A. A.; Capasso, F.; Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Science* 65 (4): 337-53, **1999**.
35. Dias, A. S. *et al.*; Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.*, v.135, nº10, p.2209-2304, **2005**.
36. Dixon, R. A.; Pasinetti, G. M; Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience, *Plant Physiology*, v. 154, p. 453–457 **2010**.
37. Dornas, W.C. *et al.* ; Flavonoides: potencial terapeutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.28, n.3, p.241-219, **2007**.
38. Ellis, G. P.; Chromenes, Chromanones and Chromones, *John Wiley*, Nova Iorque, **1963**.
39. Espín, J. C., Garcia-Conesa, Tomás-Barberán, T. A.; Nutraceuticals: facts and fiction, *Phytochemistry* 68, 2986, **2007**.
40. Farnsworth, N. R.; Akerele, O.; Bingel, A. S.; Soejarto, D. ; Guo, Z.; Medicinal plants in therapy, *Bull WHO*, 63, 965-981, **1985**.
41. Flora, S.; Izzotti, A.; Mutagenesis and cardiovascular diseases Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors; *Mutat. Res.*, 621, 5-17, **2007**.
42. Formica, J.V.; Regelson, W.: Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids, *Fd Chem. Toxic.*, v. 33, nº. 12, pp. 1061-1080, **1995**.
43. Ferguson, L. R.; Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*. v. 475, p. 89-111, **2001**.
44. Friesenecker, B.; Tsai, A. G.; Intaglietta, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg, *Int. J. Microcirc. Clin.*, v. 15, p. 17-21, **1995**.
45. Fridovich I.; Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann, YAcad Sci*; 893:13-8, **1999**.

46. Fritz, W.; Wang, H., Eltoun, I. E.; Lamartiniere, C. A; Dietary genestein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate, *Molecular and cellular Endocrinology*.V.186, p.89-99, **2002**.
47. Fukuda, R.; Kelly, B.; Semenza, L. G.; Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1, *Cancer Res.* v. 63, p. 2330-2334, **2003**.
48. Fukumoto, L. R.; Mazza, G.; Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds, *J. Agric. Food Chem.* 48, 3597, 3604, **2000**.
49. Gatto, M.T.; Falcocchio, S.; Grippa, E.; Manzzati, G.; Batinelli, L.; Giovanni, N.; Lambusta, D.; Saso, L.; Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl Ethers, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.10, n°2, p.269-272, **2002**.
50. Gibellini, L.; Pinti, M., Nasi, M.; Montagna, P. J.; De Biasi, S., Roat, E.; Bertocelli, L.; Cooper, L. E.; Cossarizza, A.; Quercetin and Cancer Chemoprevention, *Review Article* 591356, p-15, **2011**.
51. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas, *Ann, Y Acad Sci*; 899:1-14, **2000**.
52. Giordano, F.J.; Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure, *J.Clin.Invest.* v.115,n° 3, p.500-508, **2005**.
53. Goutman J.D.; Waxwmborg, M.D.; Donate-Oliver,F.,Pomate, P.E.; Calvo, D.J.; Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABBA (A) and GABBA (C) receptors, *Eur; J.Pharmacol.*, v.14,p-79-87, **2003**.
54. Guo, J. M. ; Xiao, B. X.; Dai, D.-J, Liu, Q., Ma, H.H.; Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro, *World J. Gastroentero*, 1;10(6):860-863, **2004**.
55. Gregor, W.; Grabner, G.; Adelwöhner, C.; Rosenau, T.; Gille, L. ; Antioxidant properties of natural and synthetic chromanol derivatives: study by fast kinetics and electron spin resonance spectroscopy, *J. Org. Chem.*, 70, 3472, **2005**.
56. Gusdinar, T.; Herowati, R.; Kartasasmita, R. E., Adnyana, I. K.; Antioxidant Activity of Quercetin-3, 3', 4'-Triacetate, *Journal of Pharmacology and Toxicology*, **2011**.

57. Gutierrez-Merino, C; Lopez-Sanchez, C.; Lagoa, R.; Samhan-Arias, AK.; Bueno, C.; Garcia-Martinez ,V.; Neuroprotective actions of flavonoids *Curr. Med. Chem.*, 1195-212; 18(8), **2011**.
58. Halliwell, B.; Reactive oxygen species and the central nervous system, *J. Neurochem*; 59:1609-23, **1992**.
59. Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H.; The Flavonoids, *London, Chapman & Hall*, **1975**.
60. Harborne, J. B.; Williams, C. A.; Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55:481-504, **2000**.
61. Harvey, A.L; Natural Products in drugs discovery, *Drug Discovery today*, v.13, p.894-901, **2008**.
62. Havsteen, B. H.; The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67-202, **2002**.
63. Heim, E., K.; Tagliaferro, R., A., Bobilya, J., D.; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships” *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584, **2002**.
64. Heo, H. J., Lee C.Y.; Protective effects of quercetin and vitamina C against oxidative stress-induced neurodegeneration, *J. Agric. Food Chem*; 52(25):7514-7, **2004**.
65. Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Contend of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J. Agr. Food Chem.*, v. 40, p. 2379-2883, **1992**.
66. Hirpara, K.V.; Aggarwal, P.; Mukherjee, J.; Joshi, N.; Burman, A.C.; Quercetin and its derivatives: Synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 9, 138-161, **2009**.
67. Hong, J., Smith. J. T, Ho. T.C., August. A. D.; Yang. S. C., Efects of purified green tea and black tea polyphenolics on cyclooxygenase and lipoxygenase .dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues, *Biochem. Pharmacol*, 62, 1175-1183, **2001**.
68. Hoye, A. T.; Davoren, J. E.; Wipf, P.; Fink, M.P.; Kagan, V. E.; Targeting mitochondria. *Acc.Chem. Res.*, 41, 87-97, **2008**.

69. Hou, Y. C.; Chao, P. D. L.; Ho, H. J.; Wen, C. C.; Hsiu, S. L.; Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, n° 55, p.199-203, **2003**.
70. Hsiu, S., Hou, Y.; Wang, Y.; Tsao, C.; Su, S.; Chao, P.L.; Quercetin significantly decreases cylosporin oral bioavailability in pings and rats, *Life sciences*, v.62, n.3, p.227-235, **2002**.
71. Hung, C. W.; Chen, Y.C.; Hsieh, W. L. ; Chiou, S. H. ; Kao, C. L. , Ageing and neurodegenerative diseases, *Ageing Research Reviews*, v.9 ,p-S36-S46, **2010**.
72. Hurber, L. S; Amaya-Rodriguez, D. B; Flavonóides e flavonas, *Alim. Nutr.*, v.19, n°1, p. 97-108, **2008**.
73. Ibrahim, R.K.; Flavonoids, *encyclopedia of life sciences*, **2001**.
74. IUPAC, flavonoids (isoflavonoids and neoflavonoids); <http://goldbook.iupac.org/PDF/F02424.pdf>, **2012**.
75. Ishida, H. *et al.*; Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of β -cell mass in obese diabetic db/db mice: possible protection of β cells from oxidative stress. *Metabolism*, v.53, p.488-494, **2004**.
76. Jovanovic, S. V. ; Steenken, S. ; Tosic, M. ; Marjanovic, B. ; Simic, M. G. ; *J. Am. Chem. Soc.*, 16, 4846, **1994**.
77. Ju, Y. H. et al.; Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice, *J. Nutr., Bethesda*, v.131, p. 2957-2962, **2001**
78. Jurd, L.; Rolle, L. A.; Plant Polyphenols. IV. Migration of Acetyl Groups during Alkylation of the Partial Acetates of Flavonoid Compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (20), p 5527–5531, **1958**.
79. Kenneth, D. R.; Setchell; Cassidy, A.; Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health, *J.Nutrition*, **1999**.
80. Kinghorn, A. D.; Pan, L.; Fletcher, J.N.; Chai, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs, *J. Nat. Prod.*, 74, 1539–1555, **2011**.

81. Kim, J. H. *et al.*; Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus, *Nutr. Res. Pract.*, v.5, n.2, p.107-111, **2011**.
82. Kitagawa S. Inhibitory effects of polyphenols on pglycoprotein-mediated transport, *Biol Pharm Bull*; 29(1):1-6, **2006**.
83. Koehn, F. E., Carter, G.T.; The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat Rev Drug Discov.* ; 4: 206 - 220, **2005**.
84. Kwon, H. M.; Shoi, Y.J.; Jeong, Y. J; Kang, S.W.; Kang,I.J.; Lim, S.S.; Kang; Y.H.; Antiinflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone dervatives. *J.Agric.Food Chem*, v.53, p.5150-5157, **2005**.
85. Lam, K. S.; New aspects of natural products in drug discovery, *Trends Microbiol.*15, 279–289, **2007**.
86. Lamuela-Raventos R. M., Romero-Perez A. I., Andres-Lacueva C., Tornero A., Review: Health effects of cocoa flavonoids, *Food Science and Technology International*, 11, 159-176, **2005**.
87. Larson, R. A.; The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, v.27, n.4, P 969-978, **1988**.
88. Lapidot, T.; Walker M. D, Kannner J.; Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic -cells in vitro, *J. Agric Food Chem*; 50(25):7220-5, **2002**.
89. Lautrait. S.Musonda, A. C.; Dohemer. J.Edwards. G.O, ChipmanJ.K; Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1, *Mutagenesis*, 17:45-53, **2002**.
90. Lee, K.W., Lee H. J., Surh, Y.J, Lee C.Y.; Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal, *Am J Clin Nutr*; 78:1074-8, **2003**.
91. Lin, J-K., Weng, M-S. ; Flavonoids as Nutraceuticals *In*: Grotewold, E.;“The Science of Flavonoids”, Springer Science + Business Media, Inc.; p.213-238, **2006**.
92. Murphy, M. P.; Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 1028-1031, **2008**.

93. Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T. ; Flavonóides e seu potencial terapêutico, *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, **2008**.
94. Machlin, L. J, Bendich, A., Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*; 1:441-5, **1987**.
95. Madamanchi, N.R., Hakin, Z. S.; Runge, M.S.; Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes, *J.Thromb. Haemost*, v.3 n.2, p.254-267, **2005**.
96. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81,230S 242S, **2005**.
97. Manach, C.; Scalbert, A., Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L.; Polyphenols: Food source and bioavailability, *Am. J.Clin. Nutr.*, v.79, p.727-747, **2004**.
98. Mandel, S.; Youdim, M.B.H.; Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases, *FreeRadical Biology & Medicine*, 37, 304-317, **2004**.
99. Manson, M. Cancer prevention-The potencial dor diet to modulate molecular signalling, *Trends in Molecular Medicine*, v.9 n°1, p.11-18, **2003**.
100. Marais, J. P. J; Deavours, B.; .Dixon, R. A.; Ferreira, D.: The Stereochemistry of Flavonoids In: Grotewold; The Science of Flavonoids, *Springer Science + Business Media*, Inc.; p.1-46, **2006**.
101. Martens, S.; Mithofer, A.; Flavones and Flavone synthases, *Phytochemistry Phytochem.*, 66, 2399, **2005**.
102. Materska, M.; Quercetin and its derivatives: Chemical Structure and Bioactivity, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 58, N° 4, pp.407-413, **2008**.
103. Mates, J.; Perez-Gomez, C.; Castro, I.; Glutatione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in gastric carcinoma patients, *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603; **1999**.

104. Mattarei, A.; Biasutto, L.; Marotta, E.; De Marchi, U.; Sassi, N.; Garbisa, S.; Zoratti, M.; Paradisi, C.; A Mitochondriotropic Derivative of Quercetin: A Strategy to Increase the Effectiveness of Polyphenols, *Chem Bio Chem*, 9, 2633 – 2642, **2008**.
105. Mattarei, A.; Biasutto, L.; Rastrelli, F.; Garbisa, S. Marotta, E. ; Zoratti, M. ; Paradise, C. ; Regioselective *O*-Derivatization of Quercetin via Ester Intermediates. An Improved Synthesis of Rhamnetin and Development of a New Mitochondriotropic Derivative, *Molecules*, 15, 4722-4736, **2010**.
106. 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**.
107. Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickancaite, E. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 107-116, **1999**.
108. Michalak, A.: Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress, *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15, N°. 4, 523-530, **2006**.
109. Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev*, 52, 673, **2000**.
110. Miller, D.M, Buettner, G.R, Aust S.D.; Transition metals as catalysts of autoxidation, reactions. *Free Radic Biol Med* **8**:95-108, **1990**.
111. Mishra, B.; Priyadarsinia, K. I.; Sudheerkumarb, M.; Unnikrishnanb, M. K.; Mohan, H., Pulse radiolysis studies of mangiferin: A C-glycosyl xanthone isolated from *Mangifera indica*, *Rad. Phys. Chem.* 75, 70, **2006**.
112. Mishra, B. B.; Tiwari, V. K.; Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 4769–4807, **2011**.
113. Montenegro, L.; Carbone, C.; Maniscalco, C.; Lambusta, D.; Nicolosi, G.; Ventura, C.A.; Puglisi, G. *In vitro* evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical drugs. *Int. J. Pharm.*, 336, 257-262, **2007**.

114. Moon, J. A. et al.; Quercetin pharmacokinetics in humans, *Biopharm. Drug Dispos.* v. 29, p. 205-217, **2008**.
115. Morton, L. W.; Caccetta, R.A.-A.; Puddey, I. B. ; Croft, K .D.; Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27, 152, **2000**.
116. Moura Pereira, J. M. S.; Oxidação das lipoproteínas humanos de baixa densidade, Inflamação e aterosclerose, *Tese doutoramento*, p. 4,23,26,Coimbra, **2010**.
117. Murakami, A.; Ashida, H.; Terao, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.*, 269, 315-325, **2008**.
118. Murota, K.; Terao, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism, *Arch. Biochem. Bioph.*, New York, v. 417, p. 12-17, **2003**.
119. Musialik, M.; Kuzmicz, R.; Pawłowski, T. S.; Litwinienko, G., Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids, *J. Org. Chem.*, 74, 2699, **2009**.
120. Mutoh, M. et al., Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationships, *J. Cancer Res.*, v. 91, p. 686-91, **2000**.
121. Mulholland, P. J.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hussain, S. A.; Young, A. M.; Cook, J. E.; Hodgkin, E.; Seymour, L. W. and Kerr, D. R. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, prodrug of quercetin, *Ann. Oncol.*, 12, 245-248, **2001** .
122. Newman, D.J., Cragg, G.M.; Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *Nat. Prod.*, 70:461-477, **2007**.
123. Naidu, P.S.; Singh A.; Kulkarni S. K.; Quercetin, a bioflavonoid attenuates haloperidol-induced orodyskinesia, *Neuropharmacology*, v.44, p.1100-1106, **2003**.
124. Newman, D. J.; Cragg, G. M, Snader, K. M.; The influence of natural products upon drug discovery, *Nat Prod Rep.* 17: 215 - 234, **2000**.
125. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002, *J. Nat. Prod.*, 66, 1022-1037, **2003**.

126. Nijveldt, T, J. R.; Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.* v. 74, p. 418-425, **2001**.
127. Nunomura, A.; Honda, K.; Takeda, A.; Hirai., K.; Zhu, X., Smith, M. A.; Perry, G, Oxidative Damage to RNA in Neurodegenerative diseases, *Journal of Biomedicine and biotechnology*, New York, V. 2006, n° 3, p 82323, **2006**.
128. Opara, E.C.; Oxidative stress, *Dis,Mon.*,v.52,n.5,p.183-198, **2006**.
129. Papas, A. M.; Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health, *CRC Press*, Nova Iorque, **1999**.
130. Paterson, I., Anderson, E. A.; The renaissance of natural products as drug candidates, *Science*; 310: 451 – 453, **2005**.
131. Patil, C. S.; Singh, V. P.; Satyanarayan, P, S.; Jain, N. K.; Singh, A. Kulkarni, S. K. Proctetive effect of flavonoids against agin-and lipolyssaccharide-induced cognitive impairment in mice, *Pharmacology*, v.69, p. 59-67, **2003**.
132. Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J., Flavonols and cardiovascular disease, *Molecular Aspects of Medicine* 478–494, 31, **2010**.
133. Petrozzi, L., Ricci, G., Giglioli, N. J. Siciliano, G.; Mancuso, M., Mitochondria and Neurodegeneration, *Bioscience Reports*, London, v.27.n° 1-3, p-87-104, **2007**.
134. Procházková, D.; Bousová, I.; Wilhelmová N. , Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82 (4): 513-523, **2011**.
135. Padyatty, S. J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J. H.; *Journal of the American college of Nutrition*, 22, 18-25, **2003**.
136. Qi, L. H. et al.; Antifibrotic effects of genistein and quercetin in vitro, *Yao Xue Xue Bao*, v.9, p-648-651, **2001**.
137. Quine, S. D, Raghu, P. S.; Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin induced diabetic liver, kidney and heart, *Pharmacol Rep.*; 57(5):610-5, **2005**.

138. Raso, G. M. et al.; Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1, *Life Sci.* v. 68, p. 921–31, **2001**.
139. Reiter, R. J., Oxidative processes and oxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J*; 9:526-33, **1995**.
140. Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L., Zhang, L., Flavonoids: Promising anticancer agents, *Inc. Med Res Rev*, 23, n°4, 519–534, **2003**.
141. Rey-Ladino, J.; Ross, A.G.; Cripps, A.W.; McManus, D.P.; Quinn, R. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants, *Vaccine*, 29, 6464–6471, **2011**.
142. Rice-Evans, C.; Flavonoid antioxidants, *Curr. Med. Chem.*, 8, 797, **2001**.
143. Rice-Evans, C. A. ; Packer, L., Flavonoids in Health and Disease, 2^a ed., *Marcel Dekker*, Nova Iorque, **2003**.
144. Rice-Evans, C.; Miller, N.J.; Paganga, G.; Structure –Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 20, No. 7, pp. 933-956, **1996**.
145. Ross J.A.; Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?". *Proc Natl Acad Sci U SA* 97 (9): 4411–3, **2000**.
146. Ross, J. A.; Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Cancer Suppl* 11: 26–8, **1998**.
147. Rylski, M.; Duriasz-Rowinska, H.; Rewerski, W.; The analgesic action of flavonoids in the hot plate test. *Acta.Physiol.Pol.* v.30, n° 3, p.385-8, **1975**.
148. Salgueiro, J. B.; Ardenghi, P.; Dias, M.; Ferreira, M. B.; Izquierdo, I.; Medina; *Pharmacol Biochem. Behav.*v.58, p.887-891, **1997**.
149. Sarno, S.; Moro, S.; Meggio, F.; Zagotto, G.; Dal Ben, D.; Ghibellini, P.; Battistutta, R.; Zanotti, G.; Pinna, L.A. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors, *Pharmacol. Ther.*, 93, 159-168, **2002**.

150. Scalbert, A.; Williamson, G.; Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *The Journal of Nutrition*, 2073S-2085S, **2000**.
151. Scandalios, J.G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.38, n° 7, p. 995-1014, **2005**.
152. Schroder, Spencer J.P., Rice-Evans C., Williams R.J.; Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c- Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3, *The Biochemical Journal* 358, 547-557, **2001**.
153. Shoskes, D. A.; Zeitlin, S. I.; Shahed; A; Raijfer, J.; Quercetin in men category III Chronic prostatitis: A preliminary prospective double-blind placebo-controlled trial, *Urol.*, v.54, n° 6, p.960-963, **1999**.
154. Shukla, S.; Gupta, S., Apigenin: a promising molecule for cancer prevention, *Pharm. Res*, 27, 962, **2010**.
155. Sies, H., Oxidative stress: oxidants and antioxidant, *Exp. Physiol.*, 82, 291-295, **1997**.
156. Silberberg, M.; Morand, C.; Mathevon, T.; Besson, C.; Manach, C.; Scalbert, A., Remesy, C, The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites, *Eur. J. Nutr.*, 45, 88-96, **2006**.
157. Silva, M. M.; Santos, M. R.; Caroço, G.; Rocha, R. Justino G. Mira, L., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination, *Free Radic. Res*, 36, 1219, **2002**.
158. Simões, C. *et al.*; Farmacognosia da planta ao medicamento, 2ª ed. rev. , *Porto Alegre/ Florianópolis*: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, **2000**.
159. Singh, A.; Naidu, P.S.; Kulkarni, S. K., Reserval of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid”, *Free Radic. Res*, 37 (11): 1245-52, **2003**.
160. So, F.V.; Guthrie, N.; Chambers A. F, Carroll, K.K.; Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett*; 112: 127-133, **1997**.

161. Spector L. G., Xie, Y. Robison, L. L, Heerema N.A, Hilden J.M., Lange, B. et al.; Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(3): 651–5, **2005**.
162. Spencer, J.P.; Chaudry, F.; Pannala ,A. S.; Srai, S. K.; Debnam, E.; Rice Evans ,C. A.; Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu, *Biochemical andBiophysical-Research-Communication* 27, 236-241, **2000**.
163. Stark, T.; Keller, D.; Wenker,K,; Hillmann, H.; Hofmann, T. ; Nonenzymatic C-glycosylation of flavan-3-ols by oligo- and polysaccharides, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9685, **2007**.
164. Stobiecki, M.; Kachlicki, S.; Isolation and identification of flavonoids In: Grotewold, E.; The Science of Flavonoids, *Springer Science + Business Media, Inc.*; p.1-46, **2006**.
165. Stocker, R.; Keaney, J.; Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis; *Physiol Rev*, vol.84, p-1381-1478, **2004**.
166. Tapas, A. R; Sakarkar, D. M.; Kakde, R. B.; Flavonoids as Nutraceuticals: A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 1089-1099, 7 (3), **2008**.
167. Tapiero, H. et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.56, n.5, p.215-222, **2002**.
168. Tinggi, U.; Selenium: its role as antioxidant in human health, *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13, 102-108; **2008**.
169. Turner, D. M.; Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 39-44, **1996**.
170. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J.Biochem Cell Biol.*; 39:44-84, **2007**.
171. Van Dijk, C.; Driessen, A.; Recourt, K.; The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1593–1600, **2000**.
172. Vessal, M.; Hammati, M.; Vasei, M.; Antidiabetic effects of quercetin in stroptozocin-induced diabetic rats. *Comp.biochem.Physiol.C.Toxicol.Pharmacol.* v.3, p.357-364, **2003**.

173. Visioli, F., Poli, A.; Gall, C., Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.” *Med Res Rev.* 22(1): 65-75, **2002**.
174. Weiss, R. B; Greene R.F, Knight, R.D, Collins ,J.M, Pelosi, J.J, Sulkes A, Curt G.A. Phase I and clinical pharmacology study of intravenous flavone acetic acid ,*Cancer Res*;48:5878-5882, **1988**.
175. Wheeler, D. S.; Wheeler, W. J. ; The medicinal chemistry of tea *Drug Dev. Res.*, 61, 45, **2004**.
176. WHO.FactSheetN°134.Site:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>, **2008**.
177. WHO.FactSheetN°297.Site:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, **2012**.
178. WHO.FactSheetN°317.Site:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>, **2011**.
179. Williamson, G.; Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II.Review of 93 intervention studies, *Am. J. Clin, Nutr.* 81 (Suppl. 1), 243S-255S, **2005**.
180. Winkel, B.S.J.: The Biosynthesis of Flavonoids In: Grotewold, E.; The Science of Flavonoids, Springer Science + Business Media, Inc.; p.71-96, **2006**.
181. Won., Y.; Balunas, M. J. ; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D.; Drug Discovery From Natural Sources, *The AAPS Journal* 8 (2), **2006**.
182. World Health Organization (WHO); Neurological disorders affect millions globally: Geneva: Site: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/en/index.html>, **2007**.
183. Yang, A-L.; Chen, H-I.; Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsivenessin hipercholerolemic rabbit aortae, *Atheroscler.* v.166, p.11-17, **2003**.
184. Yang, C. S.; Landau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark. H. L.; Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev., utr.* 21,381-406, **2001**.
185. Yeh, T.C.; Chiang, P.C.; Li,T.K; Hsu, C.-J.; Wang, S.-W.; Penge, C.-Y.; Guh, J.-H.; Genestein induces apoptosis in human hepatocelular carcinomas via interaction of endoplasmatic reticulum stress and mitochondrial insult, *Biochemical Pharmacology*, 73-78, **2007**.

186. Yunes, R. A., Pedrosa, R. C., & Filho, V. C.; Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil, *Quim. Nova*, 24 (1), 147-152, **2001**.
187. Zhang, L.; Demain, A. L.; Natural products in Drug Discovery and Therapeutic Medicine ; *Humana press, New Jersey*,**2005**.