

Josiane Magalhães Barbosa

Preparação e avaliação da atividade anti-inflamatória de novos derivados polifenólicos glicosilados

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e pela Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ao meu pai, que mesmo distante no tempo e no espaço, me apoiou e me apontou um horizonte (*in memoriam*).

Agradecimentos

A Deus por ter me dado querer, sonhos e uma pitada de loucura para realizá-los.

À mainha, pelo amor constante e o desejo infinito de me ter sempre em seu colo. A Chorró e João Pedro pela visita, pelo carinho e pelo apoio.

Ao meu companheiro, Pablo, pela companhia, pelo cuidado, pelos jantares, conversas e conselhos, enfim, pelo amor. Sem você nada seria tão bom.

Aos meus BELOS amigos, que foram os ausentes mais presente do mundo. Que rechearam minha mente de lembranças lindas e nostálgicas. Que abriram minhas cortinas e me mostraram o sol.

À Quiara por ouvir todas as minhas queixas e alegrias.

Às professoras Maria Teresa e Maria Manuel pela orientação, ensinamentos e pela contínua disposição em ajudar.

À Isabel Ferreira por me guiar e me ensinar tudo com muita paciência e uma didática incrível. Muito obrigada também à Joana Liberal, Cátia, Inês, Patrícia e Mariana por toda a ajuda!

Enfim, a todos que passaram pelo meu caminho e deixaram uma marquinha em minha existência.

Muitíssimo obrigada!

*E um dia os homens descobrirão que esses
discos voadores estavam apenas estudando
a vidas dos insetos...*

Mario Quintana

Resumo

Os compostos polifenólicos glicosilados possuem diversas atividades fisiológicas de grande interesse, entre as quais se destacam a atividade anti-inflamatória. Devido à elevada prevalência e intensidade de seus sinais e sintomas, a inflamação é um dos mais antigos problemas de saúde documentados (ROCK *et al.*, 2010). A inflamação pode ser definida como um mecanismo de resposta à perda de homeostasia tecidual e celular, apresentando papéis fisiológicos como defesa do hospedeiro, remodelação tecidual e regulação do metabolismo (MEDZHITOV *et al.*, 2009). Macrófagos e outras células imunes ativadas por citocinas, produtos microbianos ou ambos, induzem a transcrição da isoforma indutível da enzima sintase do óxido nítrico (iNOS) e conseqüentemente a produção do mediador pró-inflamatório óxido nítrico (NO) (BOGDAN, 2001). Em células ativadas por lipopolissacarídeo (LPS), a indução da iNOS ocorre principalmente pela via de sinalização intracelular do fator nuclear de transcrição kappa B (NF-kB) (GUZIK *et al.*, 2003). Neste sentido, compostos que têm como alvo intracelular a via de transdução de sinal NF-kB e que interrompem a cascata de produção de mediadores inflamatórios como o NO possuem um elevado potencial anti-inflamatório. O objetivo deste trabalho consiste em preparar novos derivados polifenólicos glicosilados por meio de reações biocatalíticas e estudar a sua atividade anti-inflamatória, nomeadamente na produção de óxido nítrico, induzida por LPS, numa linha celular de macrófagos de ratinho. Dessa forma, esta investigação permitiu identificar a atividade anti-inflamatória das moléculas testadas, e indicar os mecanismos de acção na via do NF-kB ou na produção de NO catalisada pela iNOS. Os novos compostos testados como anti-inflamatórios foram obtidos por semi-síntese a partir dos polifenóis naringina, rutina e polidatina, através de reações de acilação catalisadas por enzimas. A acilação enzimática constitui uma ferramenta poderosa para obter novos derivados de forma regiosseletiva sob condições reacionais suaves. Relativamente à naringina, os seus derivados acilados apresentaram melhor atividade na inibição da produção de óxido nítrico estimulada por LPS em macrófagos. Contrariamente, as acilações da rutina não alteraram significativamente a atividade da mesma. Por outro lado, as experiências realizadas com SNAP, um doador de NO, indicam que a atividade da rutina e derivados decorre de sua capacidade de "captar" NO (atividade antioxidante). As alterações físico-químicas geradas pelas acilações da polidatina, tornaram essas moléculas citotóxicas, sugerindo o seu potencial anti-tumoral, a ser futuramente investigado.

Abstract

The glycosylated polyphenol compounds have different physiological activities very interesting, among which highlight anti-inflammatory activity. Due to the elevated occurrence and intensity of its signs and symptoms, inflammation is one of the oldest health problems documented (ROCK *et. al.*, 2010). Inflammation can be defined as a feedback mechanism to loss of cellular and tissue homeostasis. Showing physiological roles as host defense, tissue modeling / repair and the regulation of metabolism (MEDZHITOV *et. al.* 2009). Macrophages and other immune cells activated by cytokines, microbial products or both induce transcription of nitric oxide synthase (iNOS) and therefore the production of pro-inflammatory mediator nitric oxide (NO) (BOGDAN, 2001). The induction of iNOS in cells activated by LPS occurs mainly by activation of NFκB transcription factor (GUZIK *et. al.*, 2003). Thus, compounds which have as intracellular target the nuclear factor NF-κB pathway and interrupting the production of inflammatory mediators such as NO cascade have a high anti-inflammatory potential. This work aims consists in preparing new derivatives glycosylated polyphenol compounds by biocatalytic reactions and to study their anti-inflammatory activity, namely in nitric oxide production induced by LPS in mouse macrophages. Thus, this investigation can identify the anti-inflammatory activity of the tested molecules, and indicate mechanisms of action in the pathway of NF-κB or in the production of nitric oxide catalyzed by iNOS. The new compounds tested as anti-inflammatory were obtained by semi-synthesis from polyphenols: naringin, rutin and polydatin, by acylation reactions catalyzed by enzymes. Enzymatic acylation is a powerful tool that allows to obtain new derivatives regioselective under mild reaction conditions. Relatively the naringin, its acylated derivatives showed improved in inhibiting nitric oxide production in macrophages stimulated by LPS. While the acetylation of rutin did not significantly alter the activity of this molecule. Otherwise, experiments with SNAP, a NO donor, indicate that rutin and derivatives act by nitric oxide scavenging. The physico-chemical changes caused by acetylation of polydatin induced cytotoxicity, leading to death of the macrophages and suggesting its antitumor potential to be further investigated.

Abreviaturas

AA - Ácido araquidónico

ACTH – Hormona adrenocorticotrófica

AINEs - Anti-inflamatórios não esteróides

AP-1- Factor ativador de proteína

AS: Espondilite Anquilosante

Asp – Aspartato

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHE - Barreira hemato-encefálica

BLys: Estimulador de linfócito B

C4H –*Cinnamate-4-hydroxylase*.

CALB – *Candida antarctica* lipase B.

CAPS: Síndrome periódica associada à Criopirina

CCF – Cromatografia em camada fina

CLRs - Recetores de lectina tipo C

CoA – Coenzima A

COX - Enzima ciclooxigenase

CpG-DNA – região do DNA contendo motivos de citosina e guanina separadas por um fosfato.

CrD: Doença de *Crohn*

CTLA: Antígeno- 4 associado aos linfócitos T citotóxicos

CYP3A4 - Citocromo P450 3A4

DAG – Diacilglicerol

DAMPs - *Damage Associated Molecular Patterns*

DEPT –*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DMARS - do inglês Disease-Modifying Antirheumatic Drugs

DMEM – Meio de *Eagle* Modificado por *Dulbecco*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DRG - dieta rica em gordura

DsRNA - *double - stranded RNA*

ECF - *Enhanced chemifluorescence*

eNOS - Isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico

FAB: fragmento de Anticorpo

FDA – *Food And Drug Administration*

Gli1 – *glioma-associated oncogene homolog1*

HMGB1 - *high mobility group box 1*

HSP - Proteínas de choque térmico

IC – Concentração inibitória

iE-DAP –g-D-glutamyl-mesodiaminopimelic acid

IFN- γ - interferão gama

I κ B - inibidor do NF- κ B

IKK - I κ B cinase

IL-1 – Interleucina 1

IND: Novo Fármaco em Investigação

iNOS – isoforma indutível da sintase do óxido nítrico

IRAK- cinase associada or recetor da Interleucina 1

JAK - *Janus Kinase*

JIA - artrite idiopática juvenil

JNK - cinase do terminal amínico da proteína c-Jun

LDL – lipoproteínas de baixa densidade

LGP2 –laboratory of genetics and physiology 2

LovD –*Leiden Open Variation Database*

LPS – Lipopolissacarídeo

Lys – Lisina

MAB - Anticorpo monoclonal

MAG – Monoacilglicerol

MDA5- Melanoma Differentiation-Associated protein 5

MDP – Ácido metilenodifosfônico

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade
MHz – Mega-Hertz
MIC - Concentração Mínima Inibitória
Mincle receptor- *macrophage inducible Ca²⁺-dependent (C-type) lectin*
mRNA – RNA mensageiro
MS: Esclerose múltipla
MuLV –*Murine Leukemia Virus*
MW 96 –placas de cultura de 96 compartimentos
MyD88 –*myeloid differentiation primary response gene 88*
NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido
NCEs – nova entidade química
NDA - *New Drug Application*
NF- κ B – factor nuclear de transcrição kappa B
NK – Natural Killer
NLRs – recetores *NOD-like*
nNOS – isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico
NO – Óxido nítrico
NOD1- Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 1
NOMID - Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease
Nu – Nucleófilo
OATP - *Organic Anion-Transporting Polypeptide*
PAL –*Phenylalanine Ammonia-Lyase*.
PAMPs – padrões moleculares associados a agentes patogénicos
PD – Polidatina
PGE synthase – sintase da Prostaglandina E
PGH2 - Prostaglandina H2
pH - potencial de hidrogénio
PN – Produtos naturais
Ppm – Parte por milhão
PRRs – Recetores de reconhecimento de padrões

PsA - Artrite psoriática

Ptch1 – *Protein patched homolog 1*

PVDV - fluoreto de polivinilidene

RA -Artrite Reumatoide

RIG-I –retinoic acid-inducible gene 1

RLR - RIG-like helicase receptors

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SAP130 – spliceosome-associated protein 130

SAR - Relação estrutura-atividade

SEM – Erro padrão da média

SGTL1 - Transportador ativo sódio-dependente

SNAP - S-nitroso-n-acetil D-L- penicilamina

SOD - enzima superóxido dismutase

ssRNA - positive-sense single-stranded RNA

STAT3- Signal transducer and ativator of transcription 3

STS - stilbene synthase

TAG – triacilglicerol

TAK -1 – cinase 1 ativada pelo \underline{I} GF- β

TGI – Tracto gastrointestinal

TLRs – Recetores *Toll-like*

TNF- α - Factor de necrose tumoral alfa

TRAF – fatores associados ao recetor do \underline{I} NF

UC - Colite ulcerativa

UV- Ultravioleta

Índice de figuras

Figura 1. O processo de fagocitose, formação do fagolisossomo e destruição do agente patogénico. Fonte: STUART et al. (2008).	5
Figura 2. Catálise da produção de superóxido (O_2^-) pela NADPH oxidase. O NADPH doa electrões que reduzem o oxigénio. Fonte: BABIOR (1999).	6
Figura 3. Vias de indução da resposta inflamatória a partir dos agentes indutores. O stress é causado por um desvio extremo dos mecanismos reguladores da homeostasia a partir dos valores normais, e a resposta de defesa é originada por uma alteração que pode causar desvio dos mecanismos reguladores. Adaptado de CHO VATIYA et al. (2014).	8
Figura 4. O endotélio ativado dos vasos sanguíneos permite o extravasamento seletivo de neutrófilos. Tal seletividade é proporcionada pela ligação de alta afinidade de selectinas das células endoteliais a integrinas presentes nos leucócitos devido à ativação por quimiocinas. Fonte: ABBAS et al. (2015).	9
Figura 5. Diferentes tipos de recetores Toll-like, seus ligandos e vias de transdução na célula do hospedeiro. Fonte: BOWIE et al. (2013).	11
Figura 6. Ativação da via de transdução do NF- κ B. A ligação LPS - TLR-4 induz uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a transcrição de genes alvo. Adaptado de ALBERTS (2009).	12
Figura 7. Exemplos da ação pró-inflamatória de citocinas e quimiocinas. Além dos efeitos locais e sistémicos benéficos, as citocinas podem afetar alguns tecidos e órgãos, gerando efeitos patológicos. Fonte: ABBAS e colaboradores (2012).	13
Figura 8. Agentes indutores da inflamação e respectivas consequências no hospedeiro. Diferentes estímulos geram uma resposta inflamatória, cujos papéis fisiológicos e as consequências patológicas são diferentes. Adaptado de Medzhitov (2008).	14
Figura 9. (A) Influência cíclica da inflamação na iniciação do tumor. As espécies reativas de nitrogénio e oxigénio agem diretamente no DNA induzindo mutações. (B) Citocinas e quimiocinas induzem fatores de transcrição nuclear que criam um ambiente favorável para o surgimento e manutenção do tumor. Adaptado de GRIVENNIKOV et al. (2010).	16
Figura 10. Estrutura do salicinato (1) e seu derivado acetilado, ácido acetilsalicílico (2).	16
Figura 11. Formação de eicosanóides a partir dos fosfolípidos membranares. Adaptado de SOROKIN (2011).	17
Figura 12. Libertação do cortisol pelas glândulas suprarrenais e mecanismos de retroalimentação.	20
Figura 13. Estratégias para inibição da via de sinalização do NF- κ B. Fonte: GILMORE et al. (2010).	26
Figura 14. Etapas dos processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, desde a fase pré-clínica até aprovação pelas entidades reguladoras.	29
Figura 15. Processo químico para a descoberta do produto natural (KOEHN et al., 2005).	30

Figura 16. O acetil-CoA tem origem na via glicolítica e na oxidação de ácido gordos. O Shiquimato é produzido pela combinação de fosfoenolpiruvato, um intermediário da via glicolítica e eritrose 4-fosfato a partir da via da pentose fosfato. O ácido mevalónico é formado por 3 moléculas de actil-CoA. Deoxixilulose-fosfato surge a partir da combinação de dois intermediários da via glicolítica, o ácido pirúvico e o gliceraldeído-3-fosfato. Fonte: DEWICK (2002).....	32
Figura 17. Exemplos de compostos dos três principais grupos de metabolitos secundários, de acordo com sua origem biossintética. (1) Polifenóis, (2) Terpenóides, (3) Alcalóides.	34
Figura 18. O ácido cafeíco é uma exemplo de polifenol que contém uma porção catecol.	37
Figura 19. Absorção e metabolismo de polifenóis. Adaptado de KEMPERMAN e colaboradores (2010).	40
Figura 20. Estrutura geral dos flavonóides e esqueleto básico de suas subclasses. Adaptado de CROZIER et al. (2009).	41
Figura 21. Captação de espécies reativas de oxigénio por flavonóides. O radical livre Flavonóide-O• pode reagir com o segundo radical, gerando uma estável estrutura quinona. Fonte: PROCHÁZKOVÁ et al., (2011).....	42
Figura 22. Fluxograma do metabolismo e absorção de flavonóides. Fonte: RICE-EVANS (2001).	43
Figura 23. Estrutura química da rutina.	44
Figura 24. Via biossintética da rutina. Adaptado de MUIR e colaboadores (2001).....	46
Figura 25. Via proposta para o catabolismo da quercetina-3-O-rutinosídeo no intestino grosso, mediado por bactérias do cólon. A seta pontilhada indica uma via de menor importância. Fonte: CROZIER et al. (2010).	50
Figura 26. Estrutura química da naringina	51
Figura 27. Estrutura básica dos estilbenos e suas formas (1) cis e (2) trans.....	55
Figura 28. A via biossintética dos estilbenos e flavonóides. A sintase do estilbeno e a sintase da chalcona, respetivamente, levam à biossintese de estilbenos e flavonóides. Fonte: KODAN <i>et al.</i> (2002).	56
Figura 29. Estrutura química da polidatina.	58
Figura 30. Mecanismo de ação proposto para a polidatina em nefropatia úrica induzida em ratinhos. Adaptado de CHEN et al. (2013).....	60
Figura 31. Esterificação enzimática de crisoeril-7-O-β-D-(3''-E-p-cumaroílo) glucopiranósido, e crisoeril-7- [6''-O-acetil- β-D-alosilo-(1→2) -β-D-glucopiranósido].	63
Figura 32. Síntese química da sinvastatina a partir da lovastatina via monocolina J.	68
Figura 33. Síntese enzimática da sinvastatina a partir da monacolina J por acilação directa.....	68
Figura 34. Hidrólise de triacentina pela lipase pancreática e esterase em função da concentração de substrato. As esterases seguem a lei de Michaelis-Menten, enquanto as lipases não. A atividade das lipases aumenta, pois acima do limite de solubilidade, o substrato apresenta-se sob a forma de micelas. Fonte: REIS e colaboradores (2009).	73

Figura 35. Mecanismo global de catálise da CALB. Uma molécula de triacilglicerol (TAG) é hidrolisada a diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG), quando a CALB está em estado aberto.....	74
Figura 36. Reações catalisadas por lipases. Fonte: CASAS-GODOY e colaboradores (2012).	75
Figura 37. Esquema geral para catálise de reações de lipases não específicas. Adaptado de KAPOOR e colaboradores (2012).	77
Figura 38. Esquema geral para reações catalisadas por lipase 1,3 – específicas. G, MG, DG e TG se referem a glicerol, monoglicerol, diglicerol e triglicerído, respectivamente. Adaptado de KAPOOR e colaboradores (2012).	78
Figura 39. (1) Ácido Eláidico (ácido (E) -octadec-9-enóico) e (2) ácido Oléico (ácido (Z) -octadec-9-enóico). Lipases obtidas de <i>C. rugosa</i> e <i>R. miehei</i> têm preferência pelo ácido oleico, ao passo que lipases obtidas a partir de <i>C. antarctica</i> tem preferência pelo ácido eláidico.	79
Figura 40. Reação de resolução cinética catalisada por lipase. (a) Resolução cinética de um racemato nucleofílico, (b) Resolução cinética de um éster racémico. Y = NH, OH, Nu = OH, OR, NH ₂ . Fonte : DE MIRANDA e colaboradores (2015).....	80
Figura 41. Exemplo do uso de lipases para acilação regioseletiva. Acilação do cloranfenicol e tianfenicol com o intuito de melhorar o gosto amargo. Fonte: CARVALHO e colaboradores (2015).	80
Figura 42. Mecanismo catalítico das lipases. Adaptado de CASAS GODOY e colaboradores (2012).	81
Figura 43. Reação de Griess. Adaptado de CONESKI e colaboradores (2012).	97
Figura 44. Modo de preparação do reagente de Griess usado nas experiências.	98
Figura 45. Reação da resazurina no teste de citotoxicidade alamar blue.....	99
Figura 46. Posições com maior probabilidade de ocorrer acilações na polidatina. ...	108
Figura 47. Estrutura do cinamato de polidatina.....	108
Figura 48. Espectro de RMN ¹ H da polidatina.	108
Figura 49. Espectro de RMN ¹³ C da polidatina	109
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H do cinamato de polidatina.....	110
Figura 51. Espectro de RMN ¹³ C do cinamato de polidatina.	111
Figura 52. Interferência gerada pelos veículos DMSO (N=1) e etanol (N=3) na produção de nitritos e viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7. As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). Os símbolos (*) indicam a diferença estatística da produção de nitritos relativamente ao controlo positivo LPS (50 ng/mL), onde (*) p<0,05.	112
Figura 53. Biossíntese de NO a partir de L-arginina, catalisada pela iNOS. O NO endógeno é sintetizado pela conversão de L-arginina a L-citrulina. Durante esta reação, o NADPH é usado como um doador de electrões e a NOH-arginina é gerada como um intermediário. Fonte: AKTAN (2004).	114
Figura 54. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), rutina e derivados. As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). Os símbolos (*) e (**) indicam a diferença estatística da produção de nitritos relativamente ao controlo positivo LPS 50 ng/mL,	

onde (*) = P < 0,05 e (**) = P < 0,01. A percentagem da produção de nitritos foi calculada relativamente à concentração do controlo positivo LPS 50 ng/mL. 118

Figura 55. Comparação entre os efeitos da rutina e seus derivados na produção de nitritos em células RAW na presença de LPS (50 ng/mL). As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente à concentração do grupo controlo positivo LPS 50 ng/mL. 119

Figura 56. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), polidatina e derivados. As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). Os símbolos (*), (**), (***) e (****) indicam a diferença estatística da produção de nitrito relativamente ao controlo positivo LPS 50 ng/mL. Os símbolos (#), (# #), (# # #), (# # # #) indicam a diferença estatística da citotoxicidade relativamente ao controlo apenas com células. Onde (*) e (#) p < 0,05; (# #) e (**) p < 0,01; (***) e (# # #) p < 0,001; (# # # #), (****) p < 0,0001. A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente à concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) por 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.** 121

Figura 57. Comparação entre os efeitos da polidatina e seus derivados na produção de nitritos em células RAW 264.7 ativadas por LPS (50 ng/mL). As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente a concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) por 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.** 122

Figura 58. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), naringina e derivados. As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). Os símbolos (*), (**) e (****) indicam a diferença estatística da produção de nitrito relativamente ao controlo positivo LPS 50 ng/mL. O símbolo (#) indica a diferença estatística entre a citotoxicidade e o controlo contendo apenas células. Onde (*) e (#) p < 0,05; (**) p < 0,01, (****), p < 0,0001. As percentagens da produção de nitrito foram calculadas relativamente à concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) durante 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.** 124

Figura 59. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), As barras e pontos dos gráficos representam a média ± SEM (N= 3). O símbolo (*) indica a diferença estatística entre a atividade dos derivados relativamente à naringina, onde (*) p < 0,05. A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente à concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) durante 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.** 125

Figura 60. Atividade de "captação de NO" da naringina e derivados. Ensaio com SNAP como doador de óxido nítrico. Os dados apresentados representam a média ± SEM (N = 3) e foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelo SNAP. Onde (*) p < 0,05 e (***) p < 0,001. 127

Figura 61. Atividade de "captação de NO" da polidatina e derivados. Ensaio com SNAP como doador de óxido nítrico. Os dados apresentados representam a média ±

SEM (N = 3) e foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelo SNAP. Onde (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$	128
Figura 62. Atividade de "captação de NO" da rutina e derivados. Ensaio com SNAP como doador de óxido nítrico. Os dados apresentados representam a média \pm SEM (N=3). Onde (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$	129
Figura 63. Expressão da iNOS na presença e ausência de LPS (1 μ g/ml). Os resultados são expressos em % de iNOS das células estimuladas com LPS (N=1). O etanol foi usado como veículo para o butirato de naringina. As percentagens foram calculadas considerando a expressão da iNOS relativamente à tubulina (iNOS/tubulina).	132
Figura 64. Expressão da iNOS na presença e ausência de LPS (1 μ g/ml), considerando o etanol com LPS como controlo (N=1). As percentagens foram calculadas considerando a expressão da iNOS relativamente à tubulina (iNOS/tubulina).	133

Lista de Tabelas

Tabela 1. Diferentes características e componentes da imunidade inata e adquirida. Adaptada de ABBAS e colaboradores (2015).	2
Tabela 2. Classes de PRRs, seus PAMPS e DAMPS e suas diferentes localizações na célula do hospedeiro. Fonte: TAKEUCHI et al. (2010). (iE-DAP: g-D-glutamyl-mesodiaminopimelic acid; MDP : Ácido metilenodifosfônico; SAP: spliceosome-associated protein 130).	4
Tabela 3. Diferentes funções das prostaglandinas produzidas pela COX-1 e COX-2. 18	
Tabela 4. Relação entre a seletividade de inibidores de COX e risco de efeito cardiovascular. Adaptado de MELNIKOVA (2005).	19
Tabela 5. Complicações comuns decorrentes do uso sistêmico de corticosteroides. Adaptada de POETKER et al. (2010).	22
Tabela 6. Fármacos biológicos aprovados para doenças autoimunes e doenças auto-inflamatórias. (MAB: Anticorpo monoclonal; JAK: Janus Kinase, FAB: fragmento de Anticorpo; CTLA-4: antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos; RA: Artrite Reumatoide; AS: Espondilite Anquilosante; JIA: artrite idiopática juvenil; MS: Esclerose múltipla; PsA: Artrite psoriática; CAPS: Síndrome periódica associada à Criopirina; BLys: Estimulador de linfócito B; UC: Colite ulcerativa). Fonte: OSTROV (2015).	24
Tabela 7. Esqueleto estrutural básico de compostos fenólicos. Adaptado de CROZIER et al. (2009).	36
Tabela 8. 12 princípios da química verde. Fonte: PRADO (2003.)	66
Tabela 9. Derivados semi-sintéticos de polifenóis obtidos por catálise enzimática....	91
Tabela 10. Polifenóis e derivados testados. Todos os compostos foram dissolvidos em etanol, exceto a Rutina e derivados, que foram dissolvidos em meio de cultura. .	98
Tabela 11. Preparação dos padrões de BSA a partir de uma solução stock com a concentração de 2000 µg/mL.....	102
Tabela 12. Rutina, naringina, polidatina e derivados acilados. As partes assinaladas a vermelho foram introduzidas por semi-síntese em catálise enzimática.	116
Tabela 13. Resultados encontrados na literatura relativamente à atividade da rutina na produção de NO por macrófagos estimulados com LPS.	119
Tabela 14. Tabela resumo dos resultados obtidos para naringina, rutina, polidatina e seus derivados acilados.	139

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimento	iii
Epígrafe	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Abreviatura	xi
Índice de figura	xv
Lista de tabelas	xxi

Parte I: Introdução geral

1. Inflamação e fármacos anti-inflamatórios	1
1.1. Resposta inflamatória aguda	9
1.2. Resposta inflamatória crónica	14
1.3. Fármacos anti-inflamatórios	16
1.3.1. Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)	16
1.3.2. Anti-inflamatórios esteróides	20
1.3.3. Fármacos biológicos imunomoduladores	23
1.3.3.1. Terapia anti-citocinas	25
1.3.3.2. Inibidores da via do NF-kB	26
2. Compostos polifenólicos	28
2.1. Fármacos de origem natural	28
2.2. Metabolitos secundários	31
2.3. Os compostos polifenólicos e sua classificação	35
2.4. Flavonóides glicosilados	40
2.4.1. Rutina	44
2.4.1.1. Atividade anti-inflamatória da rutina	47
2.4.1.2. Farmacocinética da rutina	49
2.4.2. Naringina	51
2.4.2.1. Atividade anti-inflamatória da naringina	52
2.4.2.2. Farmacocinética da naringina	54

2.5. Estilbenos glicosilados	54
2.5.1. Polidatina	58
2.5.1.1. Atividade anti-inflamatória da polidatina	59
2.5.1.2. Farmacocinética da polidatina	61
2.6. Modulação da atividade biológica de compostos polifenólicos através de modificações estruturais	62
3. Biocatálise	65
3.1. Classe de enzimas	69
3.1.1. Lipases	72
3.1.1.1. Mecanismo catalítico das serina- hidrolase	81
3.1.2. Biocatálise em solventes orgânicos	82

Parte II: Objetivos

4. Objetivos	87
4.1. Objetivo geral	87
4.2. Objetivos específicos	87

Parte III: Materiais e Métodos

5. Parte experimental	91
5.1. Semi-síntese de polifenóis acilados por biocatálise.....	91
5.1.1. Síntese regioseletiva de ésteres de polifenóis glicosilados	91
5.1.1.1. Instrumentação	91
5.1.1.2. Reagentes e solventes	92
5.1.1.3. Acilação enzimática da polidatina.....	92
5.1.2. Análise estrutural dos derivados de polifenóis	93
5.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória	95
5.2.1. Modelo biológico: macrófagos.....	95

5.2.2. Meio de cultura celular	95
5.2.3. Cultura de células	95
5.2.4. Produção de óxido nítrico (NO)	96
5.2.5. Teste de viabilidade celular (resazurina)	98
5.3. Detecção da atividade <i>scavenging</i>	99
5.4. Análise estatística dos resultados	100
5.5. Detecção de iNOS	100
5.5.1. Obtenção dos Lisados Totais	100
5.5.1.1. Cultura de células	100
5.5.1.2. Preparação do tampão RIPA	101
5.5.1.3. Lisados totais	101
5.5.2. Quantificação da proteína de extratos celulares pelo método do ácido bicinconínico (BCA)	101
5.5.3. Desnaturação da amostra	102
5.5.4. Eletroforese e electrotransferência	103

Parte IV: Resultados e discussão

6. Síntese regioseletiva de ésteres de polifenóis glicosilados.....	107
7. Testes de atividade anti-inflamatória dos derivados polifenólicos acilados..	111
7.1. Solubilização dos polifenóis	111
7.2. Avaliação da produção de óxido nítrico	114
7.2.1. Rutina e derivados	117
7.2.2. Polidatina e derivados	120
7.2.3. Naringina e derivados	123
7.3. Avaliação da atividade antioxidante dos derivados de polifenóis relativamente ao "doador de NO" s-nitroso-n-acetil-DL-Penicilamina (SNAP)	126
7.4. Análise por <i>Western Blot</i> da expressão da iNOS	131

Parte V: Conclusões e Perspectivas

8. Conclusões e Perspectivas137

Parte VI: Referências Bibliográficas

9. Referências143

Parte I

Introdução Geral

1. Inflamação e fármacos anti-inflamatórios

A inflamação pode ser definida como um mecanismo de resposta à perda de homeostasia tecidual e celular, apresentando papéis fisiológicos como defesa do hospedeiro, remodelação tecidual e regulação do metabolismo (MEDZHITOV *et al.*, 2009).

Devido à alta ocorrência e intensidade de seus sinais e sintomas, é um dos mais antigos problemas de saúde documentados (ROCK *et al.*, 2010). Existem hieróglifos sumérios referentes à inflamação que datam de 2700 a.C.; os seus famosos pontos cardinais, *Rubor* (Rubor), *tumor* (edema), *calore* (calor) e *doloren* (dor), foram descritos por Aulus Celsus no século I d.C. (GILROY *et al.*, 2015, ROCK *et al.*, 2010). O quinto ponto cardinal, perda da função, só foi acrescentado em 1958, por Rudolph Virchow (MEDZHITOV, 2010).

As sinalizações que acompanham o processo inflamatório são fundamentais para a sobrevivência das espécies, pois permitem detetar infeções, além de promoverem a nível tecidual, o processo de reparação (ABBAS *et al.*, 2008). Este fato é também evidenciado pelo risco aumentado de infeções graves em pessoas com deficiências genéticas nos componentes principais da inflamação (NATHAN, 2002).

A magnitude da resposta inflamatória assume um papel relevante na defesa do hospedeiro contra diversos sinais de “alarme” resultantes de um processo infeccioso, inflamatório, ou de destruição de tecidos. Deste modo, uma resposta insuficiente resulta em imunodeficiência, que pode desencadear infeção e cancro; uma resposta excessiva causa morbidade e mortalidade em patologias como artrite reumatóide, doença de *Crohn*, doenças neurodegenerativas, diabetes, aterosclerose e isquémia do miocárdio. Se os sinais de alarme atingirem a circulação sistémica, como ocorre na síndrome do choque séptico, *sepsis* e meningite, a resposta inflamatória é responsável por um quadro clínico muitas vezes fatal (TRACEY, 2002).

Em condições normais a resposta inflamatória do hospedeiro é programada para terminar, garantindo que o órgão afetado possa voltar ao seu estado pré-inflamatório e desempenhar sua função habitual (PERRETTI, 2015). No entanto, e

citando ABBAS *et al.* (2008) "Quando a inflamação é inapropriadamente direcionada contra os tecidos próprios ou não é adequadamente controlada, ela torna-se a causa de injúria e doença".

O sistema imunológico assume um papel preponderante na propagação e controlo da resposta inflamatória. Define-se imunidade como o somatório de todos os mecanismos de defesa presentes num organismo, cuja função é protegê-lo de agressões, como por exemplo, as doenças infecciosas (PACHECO *et al.*, 2012). A resposta imunológica pode ser subdividida em inata/natural e adaptativa/adquirida (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes características e componentes da imunidade inata e adquirida. Adaptada de ABBAS e colaboradores (2015).

	Inata	Adquirida
Características		
Especificidade	Largo espectro; reconhece moléculas comuns a microrganismos relacionados e moléculas produzidas por células lesadas do hospedeiro.	Restrita; reconhece antígenos particulares; identifica antígenos microbianos e não microbianos.
Diversidade	Limitada; codificada pela linhagem germinativa.	Muito grande; são produzidos recetores por reconhecimento somático de segmentos de genes.
Memória	Não	Sim
Componentes		
Barreiras celulares e químicas	Pele, epitélios das mucosas, moléculas antimicrobianas.	Linfócitos nos epitélios; anticorpos produzidos nas superfícies epiteliais.
Proteínas do plasma	Complemento, ficolinas, colectinas e pentraxinas	Anticorpos
Células	Fagócitos (macrófagos, neutrófilos), células natural killer (NK)	Linfócitos

A imunidade inata responde rapidamente a um grande, mas limitado, número de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunogénios ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (CRUVINEL *et al.*, 2010).

As principais células efectoras da imunidade inata são: macrófagos, monócitos, neutrófilos, esinófilos, basófilos células dendríticas e células *Natural Killer* – NK. Os seus principais mecanismos de atuação são fagocitose, libertação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, além de síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL *et al.*, 2010).

O sistema imune inato é ativado a partir do reconhecimento de padrões moleculares conservados presentes em microrganismos, chamados de PAMPs (do inglês *Pathogen Associated Molecular Receptors*). Essas estruturas permitem que o hospedeiro detecte uma vasta gama de microrganismos a partir de alguns recetores, chamados coletivamente de recetores de padrões moleculares ou PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) (CARDOSO, 2012).

Diferentes classes de microrganismos, como bactérias gram negativas e gram positivas, vírus, entre outras, expressam diferentes tipos de PAMPs. Estes componentes, presentes exclusivamente em microrganismos, podem ser ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono complexos. Geralmente as estruturas reconhecidos pelo sistema imune inato são essenciais à sobrevivência microbiana (ABBAS *et al.*, 2015).

O sistema imune inato também reconhece moléculas endógenas libertadas durante a injúria tecidual, conhecidas como DAMPs (do inglês, *Damage Associated Molecular Patterns*). Os DAMPs podem ter origem em infeções e/ou lesões assépticas. São exemplos destas estruturas proteínas induzidas por stresse como HSP (Proteínas de choque térmico), cristais como urato monossódico e proteínas moleculares como HMGB1 (High Mobility Group Box 1) (ABBAS *et al.*, 2015).

Os recetores de padrões moleculares podem ser expressos em células fagocíticas ou células não especializadas como fibroblastos, células epiteliais e

endoteliais. Atualmente existem quatro classes de PRRs identificadas. Estas famílias incluem proteínas de membrana como receptores *Toll-like* (TLRs) e receptores de lectina tipo C (CLRs), e proteínas citoplasmáticas como receptores *RIG-like* (RLR) e *NOD-like* (NLRs) (TAKEUCHI *et al.*, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2. Classes de PRRs, seus PAMPS e DAMPS e suas diferentes localizações na célula do hospedeiro. Fonte: TAKEUCHI *et al.* (2010). (iE-DAP: g-D-glutamyl-mesodiaminopimelic acid; MDP : Ácido metilenodifosfônico; SAP: spliceosome-associated protein 130).

PRRs	Localização	Ligando	Origem do ligando
TLRs			
TRL1	Membrana plasmática	Lipoproteína Triacil	Bactérias
TRL2	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bactérias, vírus, parasitoses e própria
TRL3	Lisossomas	DsRNA	Vírus
TRL4	Membrana plasmática	LPS	Bactéria, vírus e própria
TRL5	Membrana plasmática	Flagelina	Bactéria
TRL6	Membrana plasmática	Lipoproteína diacil	Bactéria, vírus
TRL7 (TRL8 humano)	Lisossomas	ssRNA	Vírus, bactéria e próprio
TRL9	Lisossomas	CpG-DNA	Vírus, bactéria, protozoário e próprio
TRL10	Lisossomas	Desconhecido	Desconhecido
TRL11	Membrana plasmática	Moléculas semelhantes a profilina	Protozoário
RLRs			
RIG-I	Citoplasma	Fragmentos curtos de dsRNA, 5-trifosfato dsRNA	RNA de vírus, DNA de vírus
MDA5	Citoplasma	Fragmentos longos de RNA	RNA vírus (Picornaviridae)
LGP2	Citoplasma	Desconhecido	RNA Vírus
NLRs			
NOD1	Citoplasma	iE -DAP	Bactéria
NOD2	Citoplasma	MDP	Bactéria
CLRs			
Dectin-1	Membrana plasmática	B-Glucan	Fungo
Dectin-2	Membrana plasmática	B-Glucan	Fungo
MINCLE	Membrana plasmática	SAP130	Próprio e Fungo

Com a exceção de alguns NLRs, a ligação dos PRRs a PAMPs e DAMPs regula positivamente a transcrição de genes envolvidos nas respostas inflamatórias, como

NF- κ B, fator regulador do interferon, proteína ativadora 1, bem como a regulação pós-transcricional de mRNA (KUMAGAI *et al.*, 2010).

Os PRRs podem atuar também como recetores de reconhecimento para o processo fagocítico de agentes patogénicos invasores. Além dos PRRs, atuam nessa função os recetores de alta afinidade de opsoninas como anticorpos, proteínas do sistema complemento e lectinas plasmáticas (ABBAS *et al.*, 2015); a opsonização tem por objetivo facilitar a fagocitose, através da mediação do processo de reconhecimento pelas células efectoras (PACHECO *et al.*, 2012). A fagocitose por opsonização constitui uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida, sendo os anticorpos produzidos por linfócitos B (ABBAS *et al.*, 2015).

A fagocitose compreende o processo pelo qual as partículas são reconhecidas, ligadas à superfície celular e internalizadas em organelos, chamadas de fagossomas. O reconhecimento por recetores, ativa numerosas vias de sinalização que coordenam alterações como rearranjo do citoesqueleto, cuja orientação ocasiona o movimento circunferencial da membrana para internalizar partículas a ela ligadas. Neutrófilos e macrófagos são capazes de envolver partículas maiores que a sua própria área de superfície (STUART *et al.*, 2008) (Figura 1).

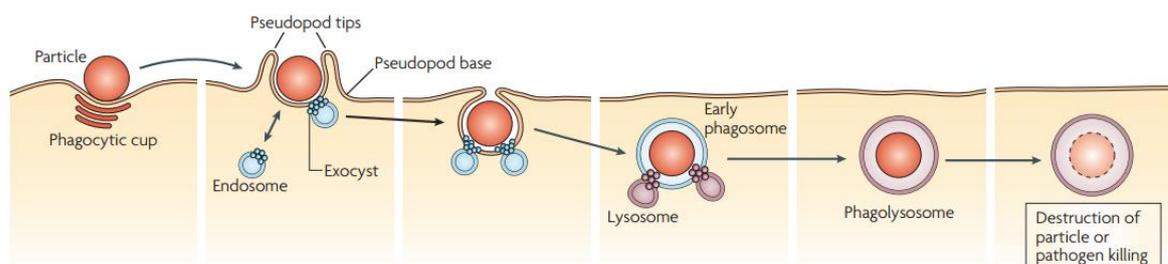


Figura 1. O processo de fagocitose, formação do fagolisossomo e destruição do agente patogénico. Fonte: STUART *et al.* (2008).

A fagocitose é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata, são exemplos de fagócitos os neutrófilos e macrófagos. Quando estas células são fortemente ativadas, libertam moléculas antimicrobianas para o meio extracelular. Estes mediadores altamente potentes têm ação indiferenciada sobre qualquer tipo de

célula, sendo inevitável o dano colateral ao tecido do hospedeiro (ABBAS *et al.*, 2015).

Os três principais mecanismos antimicrobianos usados por fagócitos são:

(1) Espécies reativas de Oxigênio: o oxigênio molecular é relativamente inerte, mas pode ser reduzido enzimaticamente a superóxido. A produção de superóxido por fagócitos profissionais requer redução equivalente de NADPH e coincide com um período de consumo rápido de oxigênio, referida como a explosão respiratória (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2001) (Figura 2). O O_2^- gerado pela enzima serve como material de partida para a produção de um vasto número de agentes oxidantes reativos, incluindo halogénios oxidados, radicais livres e oxigênio atômico (BABIOR, 1999).

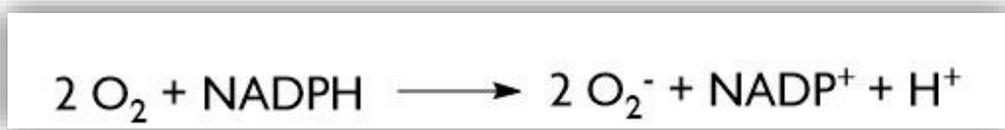


Figura 2. Catálise da produção de superóxido (O_2^-) pela NADPH oxidase. O NADPH doa electrões que reduzem o oxigênio. Fonte: BABIOR (1999).

(2) Óxido nítrico: sintetizado pela enzima indutível da sintase óxido nítrico (iNOS). A iNOS é uma enzima citosólica ausente em macrófagos em repouso, mas induzida em resposta a produtos microbianos que ativam TLR. A iNOS catalisa a conversão de arginina a citrulina, com liberação do radical gasoso óxido nítrico de difusão livre (ABBAS *et al.*, 2015). Estudos em ratinhos *Knockout* mostram que a função cooperativa e redundante de ROS e óxido nítrico tornam os animais menos suscetíveis a infeções por salmonella (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2001), *Coxiella burnetii* (BRENNAN *et al.*, 2004) e *Mycobacterium tuberculosis* (ADAMS *et al.*, 1997) do que aqueles que expressam apenas a oxidase fagocitária ou a iNOS.

(3) Enzimas proteolíticas: são produzidas diversas enzimas proteolíticas nos fagoliossomos de neutrófilos e macrófagos, sendo uma das mais importantes a elastase. BELAAOUAJ e colaboradores (1998) compara a resposta de ratinhos deficientes em elastase com ratinhos normais, após infeção por *Klebsiella*

pneumoniae, *E. Coli* e *S. Aureus*; e conclui que os modelos animais deficientes em elastase tem menor atividade bactericida para *Klebsiella pneumoniae* e *E. Coli*; mas para *S. Aureus* não houve diferenças entre os dois grupos, mostrando assim a importância da elastase para a morte de bactérias gram-negativas. Outro estudo mostra que ratinhos deficientes em elastase são susceptíveis à infecção por *Aspergillus fumigatus* (TKALCEVIC *et al.*, 2000).

Após o englobamento e morte dos microrganismos, os leucócitos fagocíticos, especialmente as células dendríticas, expressam à superfície celular peptídeos associados a moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade ou MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Os peptídeos associados a MHC são reconhecidos por linfócitos T, iniciando uma resposta imune adaptativa. Assim, a fagocitose atua nas células efetoras da imunidade inata e é também responsável pela ativação da imunidade adquirida (GREENBERG *et al.*, 2002, JUTRAS *et al.*, 2005).

A imunidade adaptativa é baseada em recetores gerados por mecanismos somáticos durante a ontogénese individual de cada organismo. Estes mecanismos geram um repertório diverso de recetores antigénicos com variações específicas, que são clonalmente distribuídos em dois tipos de linfócitos: células T e células B (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

Além do processo induzido por infeções a resposta inflamatória pode estar associada a outros agentes causadores. Segundo CHOVIATYIA e colaboradores (2014), a resposta inflamatória pode ser provocada por dois tipos de estímulos (Figura 3):

- 1) **Grandes desvios nos mecanismos reguladores da homeostasia tecidual**, como número de células por compartimento tecidual, posição das células, níveis de O₂, níveis de nutrientes, pH do fluido intersticial, entre outros. Este tipo de inflamação é uma extensão do stresse celular, presente em muitas doenças inflamatórias crónicas. Na obesidade, por exemplo, a capacidade de armazenamento de gordura pelos adipócitos é excedida, resultando em stresse

tecidual com produção de citocinas inflamatórias, que iniciam e perpetuam um estado inflamatório.

2) **Presença de estímulos patogénicos, toxinas, alergénios ou lesão tecidual** que afetam indiretamente os mecanismos reguladores e perturbam a homeostasia, induzindo a inflamação aguda, que em alguns casos evolui para inflamação crónica.

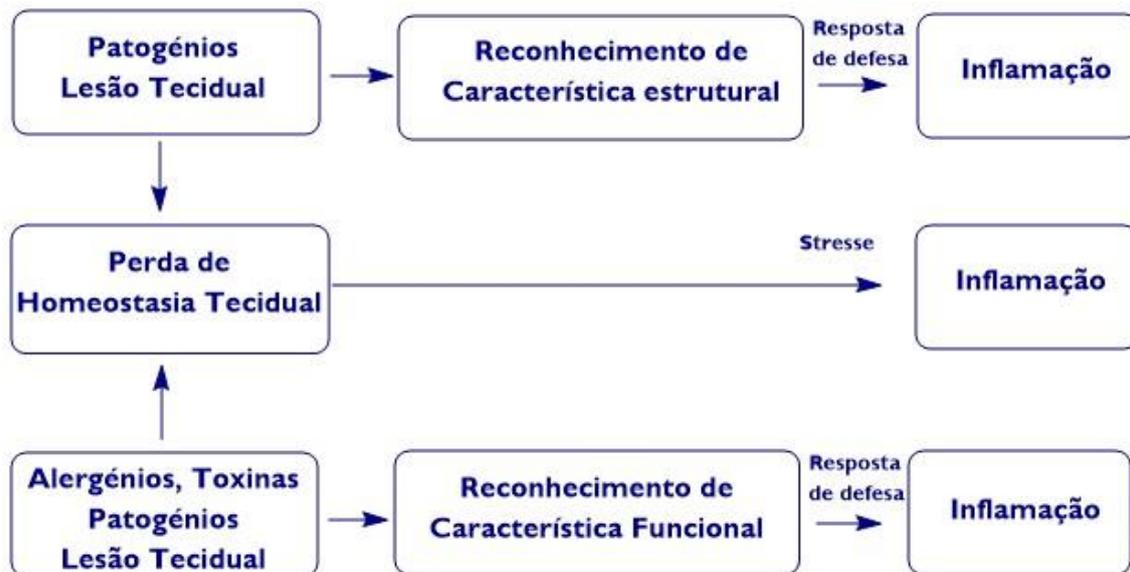


Figura 3. Vias de indução da resposta inflamatória a partir dos agentes indutores. O stresse é causado por um desvio extremo dos mecanismos reguladores da homeostasia a partir dos valores normais, e a resposta de defesa é originada por uma alteração que pode causar desvio dos mecanismos reguladores. Adaptado de CHOVIYA *et al.* (2014).

O processo inflamatório pode ser classificado como agudo ou crónico dependendo do agente causal, da sua duração e das características celulares. A resposta inicial a uma injúria tecidual pode ser tanto uma inflamação aguda quanto crónica. Quando o processo inicial é uma inflamação aguda, e não se obtém resolução, a resposta inflamatória persiste e adquire novas características celulares. E se estas modificações ainda forem insuficientes, ocorre uma conversão para o estado inflamatório crónico (MEDZHITOV, 2008).

Consideráveis progressos têm sido feitos na elucidação dos eventos celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória aguda. No que se diz respeito à

inflamação crônica tais mecanismos ainda permanecem pouco conhecidos, principalmente aqueles ligados à inflamação sistêmica (MEDZHITOV, 2008).

1.1. Resposta inflamatória aguda

A resposta inflamatória aguda pode-se desenvolver em minutos ou horas e perdurar por dias. Envolve um envio coordenado de proteínas do plasma e leucócitos da circulação sanguínea para os locais de infecção ou lesão tecidual (ABBAS *et al.*, 2008). Em casos de infecções, estabelece-se memória imunológica de forma que o hospedeiro desenvolva uma resposta mais rápida e específica se houver uma futura invasão pelo mesmo agente patogênico (GILROY *et al.*, 2015).

A inflamação aguda é classicamente induzida por infecções, toxinas, alergênicos ou lesão tecidual. O processo inicia-se com a liberação de quimiocinas e mediadores solúveis a partir de células locais, incluindo células endoteliais vasculares, células dendríticas, macrófagos e fibroblastos intersticiais. Estes eventos modulam as proteínas de adesão local e geram um gradiente quimiotático que recruta células a partir da circulação sanguínea (FUJIWARA *et al.*, 2005) (Figura 4).

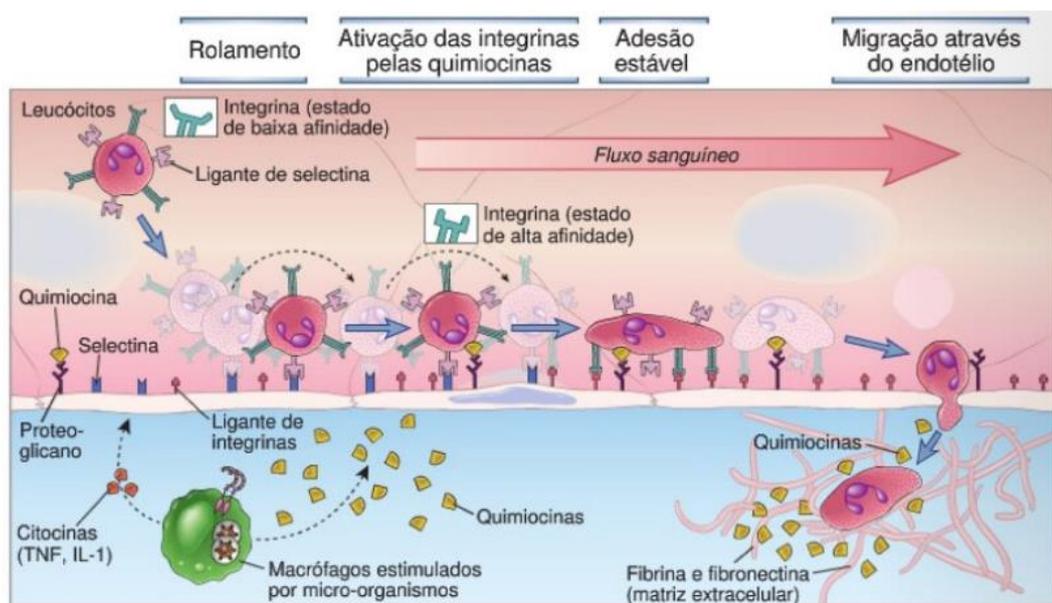


Figura 4. O endotélio ativado dos vasos sanguíneos permite o extravasamento seletivo de neutrófilos. Tal seletividade é proporcionada pela ligação de alta afinidade de selectinas das células endoteliais a integrinas presentes nos leucócitos devido à ativação por quimiocinas. Fonte: ABBAS *et al.* (2015).

O sistema imune inato é o maior contribuinte para a inflamação aguda induzida por infecções ou danos teciduais (TAKEUCHI *et al.*, 2010). As células efetoras são estimuladas por recetores de reconhecimentos padrão. Os recetores *toll-like* são os mais amplamente estudados e são considerados como sensores primários de agentes patogénicos (KUMAR *et al.*, 2011).

Os TLRs são proteínas transmembranares do tipo I com domínio extracelular contendo uma série de repetições ricas em leucina que medeiam o reconhecimento de PAMPs. Foram identificados 12 tipos funcionais de TLRs em humanos (KAWAI *et al.*, 2010).

Os TLRs podem ser divididos em dois subgrupos dependendo de sua localização celular e ligandos PAMPs. O primeiro grupo é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, expressos em superfície celular, onde reconhecem principalmente componentes de membrana microbiana como lipídios, lipoproteínas e proteínas; o segundo grupo é composto de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, expressos em vesículas intracelulares como retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos e endolisossomos, onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos (KAWAI *et al.*, 2010) (Figura 5).

A resposta imune inata a um determinado microrganismo reflete uma integração de respostas de muitos TLRs a diferentes moléculas produzidas pelos mesmos (FUJIWARA *et al.*, 2005). Os produtos microbianos que estimulam os TLRs incluem os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas (TLR-4); peptidoglicano, ácido lipoteicoico e lipoarabinomanano de bactérias gram-positivas (TLR-2); flagelina (TLR-5); e motivos CpG bacterianos não metilados (TLR-9) (FUJIWARA *et al.*, 2005).

Os TLRs expressos em vesículas intracelulares são responsáveis principalmente pela resposta imune viral. O TLR3 reconhece RNA de cadeia dupla (dsRNA) de vírus em replicação e o ácido poliinosínico-policitidílico (poly (I:C)), induzindo uma resposta imune viral. O TLR7 reconhece RNA de cadeia simples (ssRNA) derivado a partir de vírus como influenza A e o vírus da imunodeficiência humana. O TLR8 reconhece RNA de cadeia simples (ssRNA). O TLR9 reconhece motivos de DNA 2-

deoxy ribo(citidina-fosfato guanosina) desmetilados frequentemente presentes em bactérias e vírus (KAWAI *et al.*, 2010).

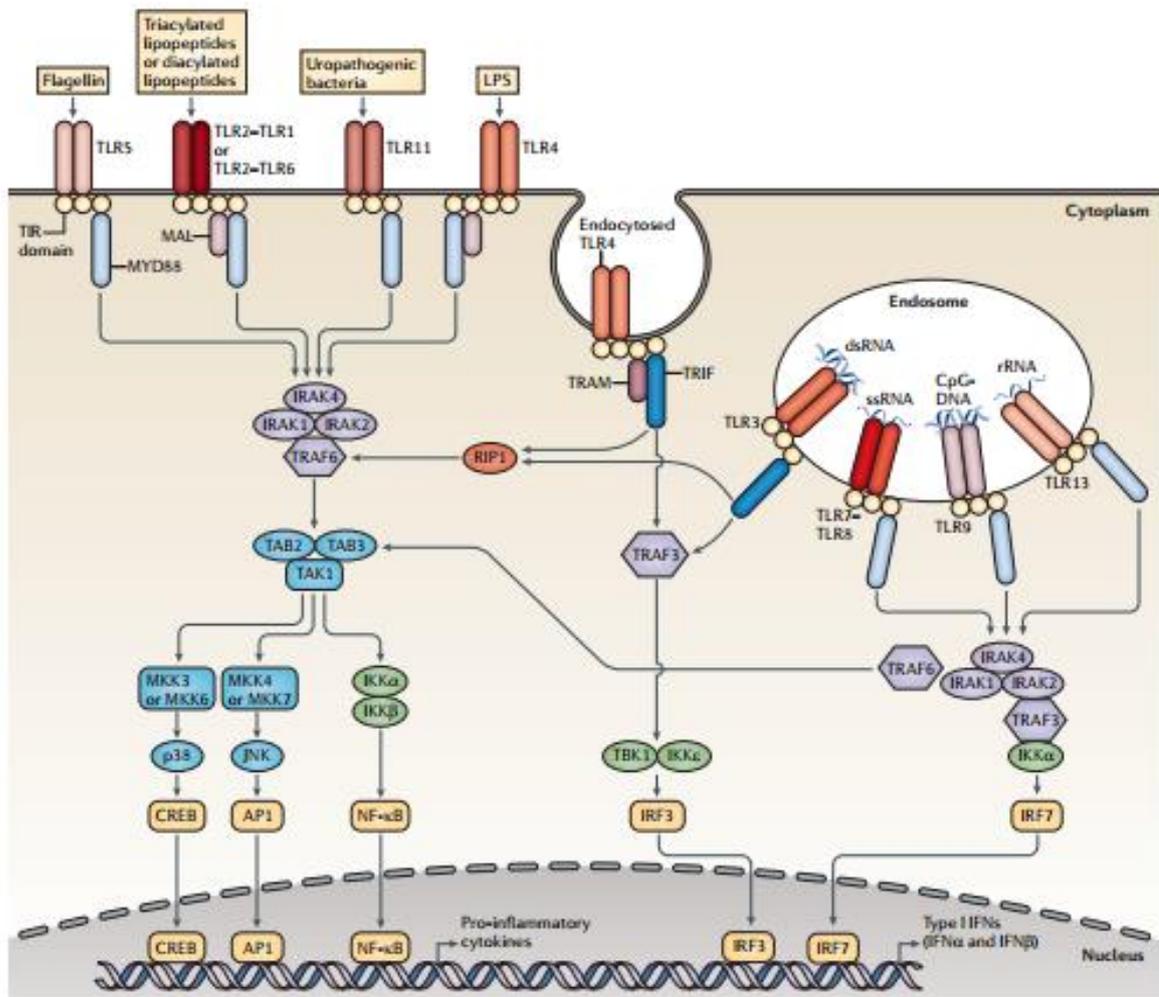


Figura 5. Diferentes tipos de receptores *Toll-like*, seus ligandos e vias de transdução na célula do hospedeiro. Fonte: BOWIE *et al.* (2013).

As respostas mediadas por TLR ativam, entre outras, a via de sinalização do NF-κB. As proteínas NF-κB são fatores de transcrição envolvidos na maioria das respostas do sistema imune relacionadas com stress e inflamação. A ativação dos TLRs desencadeiam uma ubiquitinação multiproteica e uma cascata de fosforilações que libertam o NF-κB de um complexo protéico inibidor, possibilitando a sua translocação para o núcleo, com consequente transcrição de centenas de genes alvo (ALBERTS *et al.*, 2009) (Figura 6).

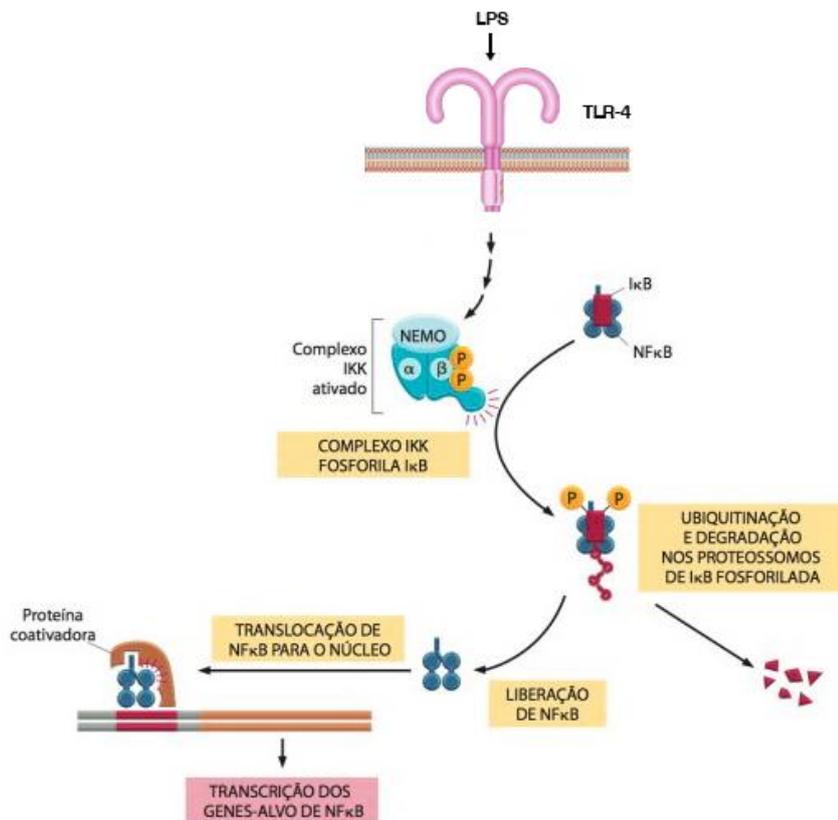


Figura 6. Ativação da via de transdução do NF-κB. A ligação LPS - TLR-4 induz uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a transcrição de genes alvo. Adaptado de ALBERTS (2009).

Dentro do grupo de proteínas sintetizadas em resposta ao NF-κB, incluem-se citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e TNF-α), moléculas de adesão endotelial e proteínas envolvidas em mecanismos microbicidas, incluindo a iNOS (FUJIWARA *et al.*, 2005). Quando ativado, o NF-κB é ainda responsável pela expressão da sua proteína inibidora IκBα que mantém o fator de transcrição NF-κB inativo no citosol de células em repouso, criando um circuito de retroalimentação negativa (ALBERTS *et al.*, 2009)

As citocinas pró-inflamatórias têm muitos efeitos locais e sistêmicos que contribuem para a defesa do hospedeiro. A febre, por exemplo, apesar de não se conhecer com detalhe os mecanismos celulares e moleculares subjacentes, tem a função de ajudar a combater a infecção, pois a maioria dos agentes patogênicos bacterianos e virais proliferam melhor a temperaturas mais baixas, enquanto a

resposta imune adaptativa é mais potente a temperaturas mais altas (ALBERTS *et al.*, 2009) (Figura 7).

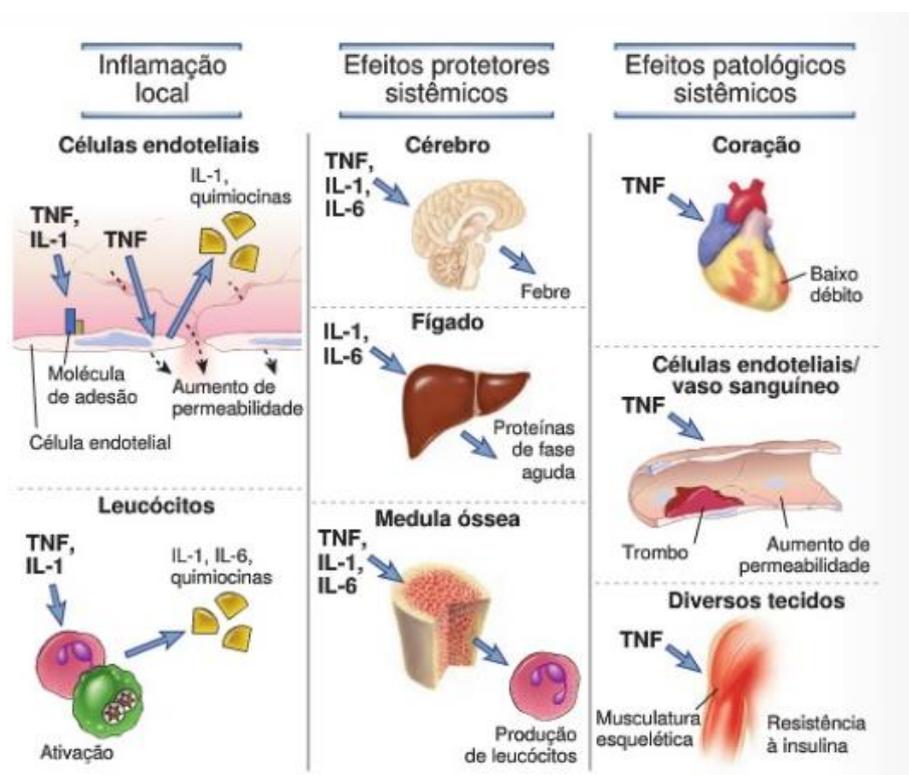


Figura 7. Exemplos da ação pró-inflamatória de citocinas e quimiocinas. Além dos efeitos locais e sistêmicos benéficos, as citocinas podem afetar alguns tecidos e órgãos, gerando efeitos patológicos. Fonte: ABBAS e colaboradores (2012).

A inflamação aguda pode resultar de trauma tecidual, na ausência de microrganismos, recentemente referida como inflamação estéril. A inflamação estéril também é marcada pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Os PRRs reconhecem e ativam vias pró-inflamatórias a partir de componente não infecciosos que podem causar dano tecidual ou através de DAMPs, que funcionam da forma similar aos PAMPs (CHEN *et al.*, 2010).

A eliminação do componente que causou o insulto original geralmente corresponde ao fim da resposta inflamatória aguda. A transição para o estado homeostático é um processo ativo e regulado, conhecido como resolução da inflamação. Se o agente causador não é eliminado, a fase de resolução pode não ser induzida e um estado inflamatório crônico poderá surgir (MEDZHITOV, 2010).

1.2. Resposta inflamatória crónica

A inflamação crónica perdura por semanas, meses ou anos e mantém simultaneamente a inflamação, destruição e reparação tecidual com angiogénese e fibrose. Ela pode seguir-se à inflamação aguda ou pode iniciar-se insidiosamente, como uma resposta latente de baixo grau, causando doenças como a artrite reumatóide, aterosclerose, tuberculose e fibrose pulmonar (ABBAS *et al.*, 2008) (Figura 8).

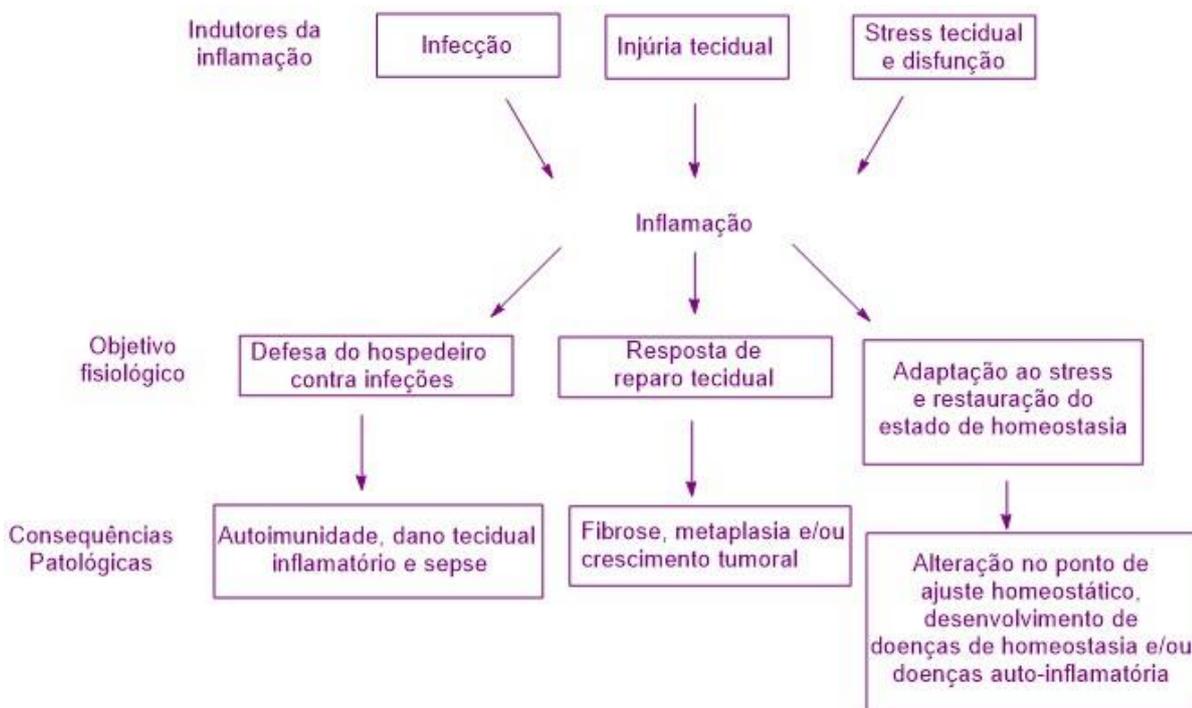


Figura 8. Agentes indutores da inflamação e respectivas consequências no hospedeiro. Diferentes estímulos geram uma resposta inflamatória, cujos papéis fisiológicos e as consequências patológicas são diferentes. Adaptado de Medzhitov (2008).

Para KOTAS *et al.* (2015), as doenças da sociedade atual, como Alzheimer, diabetes tipo 2, autoimunidade e alergias apresentam duas características em comum: envolvem desequilíbrio homeostático e são quase universalmente ligadas à inflamação crónica. O aumento da incidência dessas doenças está associado a drásticas mudanças na interação homem-meio, onde os genes evolutivamente selecionados para proteção contra infeções, injúria, fome e predadores, podem

agora, na ausência de alguns desses desafios, contribuir para o surgimento de tais patologias (KOTAS *et al.*, 2015).

Histologicamente, a inflamação crónica é caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA *et al.*, 2005). Durante esta fase da inflamação, a libertação de citocinas resulta na quimiotaxia, ativação e retenção de macrófagos no local inflamatório. Tais células sintetizam cronicamente baixos níveis de IL-1 e TNF- α , responsáveis por alguns sintomas clínicos como anorexia, caquexia, sonolência e leucocitose (FEGHALI *et al.*, 1997).

A ativação dos macrófagos resulta em dano tecidual, devido aos altos níveis de enzimas lisossómicas, ROS e NO, constituindo uma das marcas da inflamação crónica. A destruição tecidual contínua pode, por si só, ativar a cascata inflamatória, de modo que as características de ambas as inflamações, aguda e crónica, poderão coexistir em certas circunstâncias (ABBAS *et al.*, 2008).

A ativação do NF- κ B também está associada a numerosas doenças inflamatórias crónicas e cancro. Evidências experimentais sugerem um papel central do NF- κ B tanto na fase de iniciação como na perpetuação da inflamação crónica (MAKAROV, 2000).

Estudos científicos recentes sustentam que várias doenças do foro oncológico são iniciadas a partir de infeções: mais de 20% de todos os tipos de cancro estão ligados a infeção crónica (AGGARWAL *et al.*, 2009). Na resposta inflamatória crónica a presença concomitante de inflamação e regeneração tecidual, permite que o peroxinitrito, produzido durante a reação entre espécies reativas de nitrogénio e oxigénio, interaja com o DNA do epitélio em proliferação resultando em permanentes alterações genómicas como mutações, deleções e/ou rearranjos (COUSSENS *et al.*, 2002) (Figura 9).

O fator nuclear NF- κ B e o STAT3 são os dois fatores de transcrição mais relevantes na ativação das vias inflamatórias e desempenham papéis importantes na tumorigénese, pelo que representam atrativos alvos terapêuticos para a prevenção e

terapia do cancro. O STAT3 é um fator de transcrição latente que medeia a transcrição de citocinas e fatores de crescimento (AGGARWAL *et al.*, 2009).

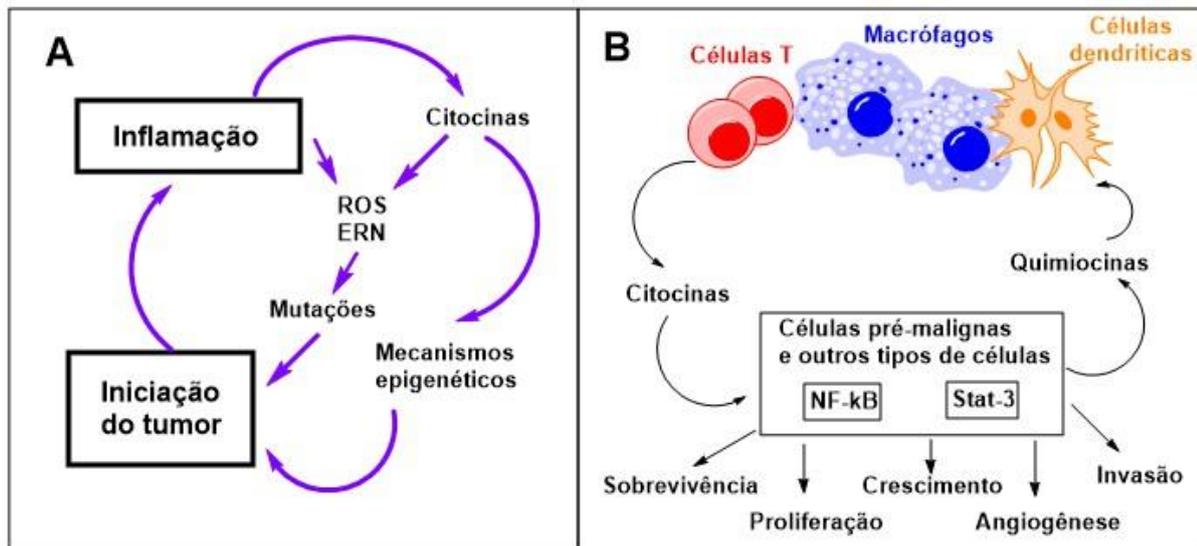


Figura 9. (A) Influência cíclica da inflamação na iniciação do tumor. As espécies reativas de nitrogénio e oxigénio agem diretamente no DNA induzindo mutações. (B) Citocinas e quimiocinas induzem fatores de transcrição nuclear que criam um ambiente favorável para o surgimento e manutenção do tumor. Adaptado de GRIVENNIKOV *et al.* (2010).

1.3. Fármacos anti-inflamatórios

1.3.1. Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)

Em 1897, inspirado pelo efeito do salicinato presente em extratos vegetais, Felix Hoffman criou a aspirina. A habilidade deste fármaco anti-inflamatório não esteróide (AINE) em reduzir a dor, inflamação e febre tornou-o um dos fármacos mais vendidos da história (DINARELLO, 2010) (Figura 10).

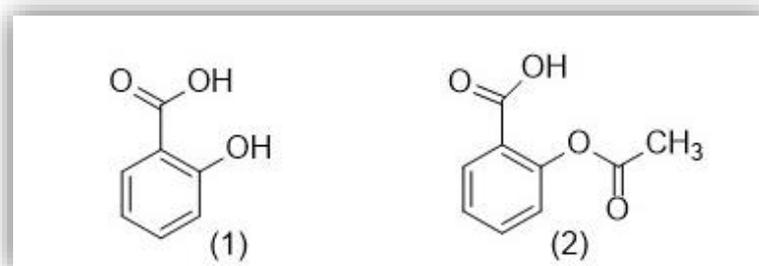


Figura 10. Estrutura do salicinato (1) e seu derivado acetilado, ácido acetilsalicílico (2).

Apesar do amplo uso de anti-inflamatórios não esteróides ao longo do último século, o seu mecanismo de ação só foi clarificado em 1971, quando John Robert Vane publicou que a atividade anti-inflamatória dos AINES estava ligada à sua capacidade de inibição da enzima ciclooxigenase (COX) (VANE, 1971).

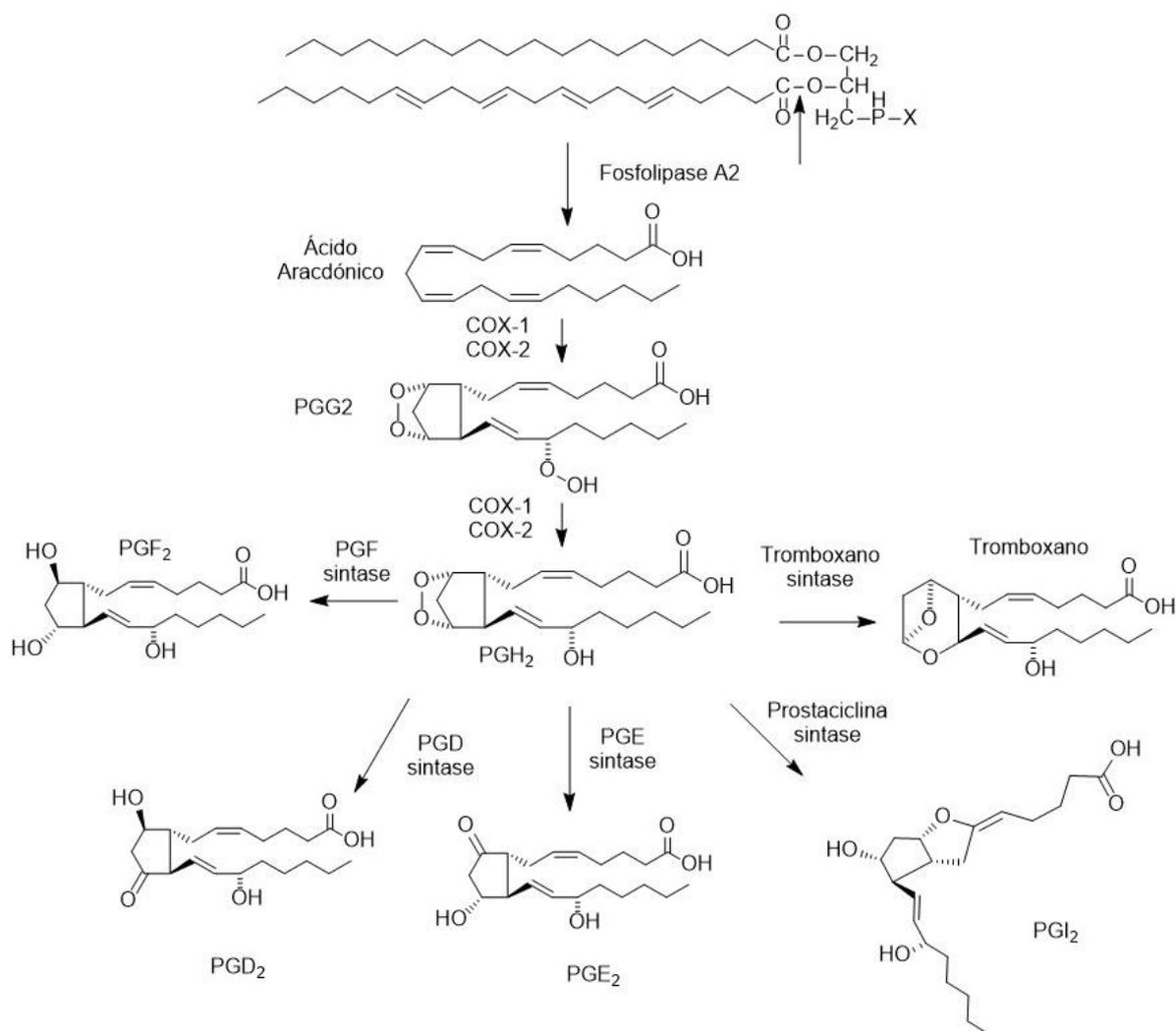


Figura 11. Formação de eicosanóides a partir dos fosfolípidos membranares. Adaptado de SOROKIN (2011).

As enzimas COXs sintetizam eicosanóides que desempenham, entre outras ações específicas a nível celular, a atividade pró-inflamatória. A etapa limitante para a produção de eicosanóides é a ativação da fosfolipase A2, que produz ácido araquidônico (AA) a partir dos fosfolípidos membranares. O AA libertado é ciclizado e reduzido pela COX originando PGH₂ que, através de sintases específicas e expressas

em diferentes células, como a PGE sintase, PGI sintase e a Tromboxano sintase, origina diversos eicosanóides com atividade pró-inflamatória (KATORI *et al.*, 2000) (Figura 11).

A Cicloxigenase apresenta-se sob duas isoformas distintas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células e produz principalmente prostanóides de função fisiológica normal. A COX-2, ao contrário, é induzida por citocinas, stresse e fatores de crescimento e é a principal fonte de prostanóides na inflamação e cancro. Há processos fisiológicos e fisiopatológicos em que essas enzimas atuam em coordenação (BRUNTON *et al.*, 2011) (Tabela 3).

Tabela 3. Diferentes funções das prostaglandinas produzidas pela COX-1 e COX-2.

Prostaglandinas	
COX-1	COX-2
Geralmente funções fisiológicas	Geralmente funções fisiopatológicas
Proteção da mucosa digestiva	Edema
Controle do fluxo sanguíneo renal	Hiperalgisia
Hemostasia	Febre
Contribui para Hiperalgisia	Funções importantes no sistema nervoso, reprodutor e renal.

As prostaglandinas são importantes mediadores pró-inflamatórios, fato evidenciado pela eficácia e amplo uso de inibidores de COX como anti-inflamatórios. Praticamente todos os AINES, incluindo inibidores seletivos de COX-2, apresentam atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória. Os AINES são usados principalmente no tratamento de patologias do foro músculo-esquelético, tais como artrite reumatoide e osteoartrite, apresentando claros benefícios terapêuticos em patologias associadas a hiperalgisia e inflamação. No entanto, não são considerados

medicamentos anti-reumáticos modificadores da doença (DMARS, do inglês Disease-Modifying Antirheumatic Drugs) (BRUNTON *et al.*, 2011).

Devido à ampla variedade de funções dos prostanóides na resposta fisiológica normal, a sua supressão através da inibição das COXs leva a efeitos adversos indesejáveis. Indivíduos tratados com AINES por curtos períodos de tempo podem ter efeitos adversos ao nível do trato gastrointestinal e renal. Cerca de 25% das pessoas que usam AINES apresentam efeitos adversos e mais do que 5% desenvolvem sérios problemas de saúde (TURINI *et al.*, 2002).

Após a descoberta da COX-2 em 1991, passaram a ser sintetizados fármacos seletivos para essa enzima com o objetivo de se obterem compostos mais potentes e com menos efeitos secundários. Os COXIBs (rofecoxibe, valdecoxibe, celecoxibe) tornaram-se disponíveis no mercado a partir de 1999 e apresentavam reduzida toxicidade gastrointestinal. No entanto, em 2004 e 2005 dois destes três medicamentos comercializados foram retirados do mercado e os celecoxibes passaram a ter tarja preta na embalagem, pois o uso prolongado mostrou alterações renais e hemostáticas, aumentando o risco de enfarte do miocárdio e trombose (LAMANO-CARVALHO, 2007) (Tabela 4).

Tabela 4. Relação entre a seletividade de inibidores de COX e risco de efeito cardiovascular. Adaptado de MELNIKOVA (2005).

Fármaco	Relação da seletividade COX-2/COX-1	Efeito Cardiovascular
Naproxeno	Inibe COX -1 e COX-2, pequena seletividade	Baixa
Diclofenaco, ibuprofeno, piroxicam , cetoprofeno, indometacina	Inibe COX -1 e COX-2, pequena seletividade	Moderada
Celocoxibe	30	Moderada
Refecoxib	276	Alta
Valdecoxib	261	Alta
Etoricoxib	344	Alta
Lumiracoxib	433	Moderada até 1 ano (dados de longo período não disponíveis)

1.3.2. Anti-inflamatórios esteróides

Os corticosteróides endógenos são sintetizados pelo córtex das glândulas suprarrenais por indução da hormona adrenocorticotrófica (corticotrofina) (ACTH) libertada pela hipófise (Figura 12). Os corticosteróides e seus derivados sintéticos biologicamente ativos podem ser do tipo glicocorticóide e mineralocorticóide. Os glicocorticóides desempenham funções metabólicas e os mineralocorticóides atuam na regulação do equilíbrio hidroelectrolítico (ERRANTE *et al.*, 2015).

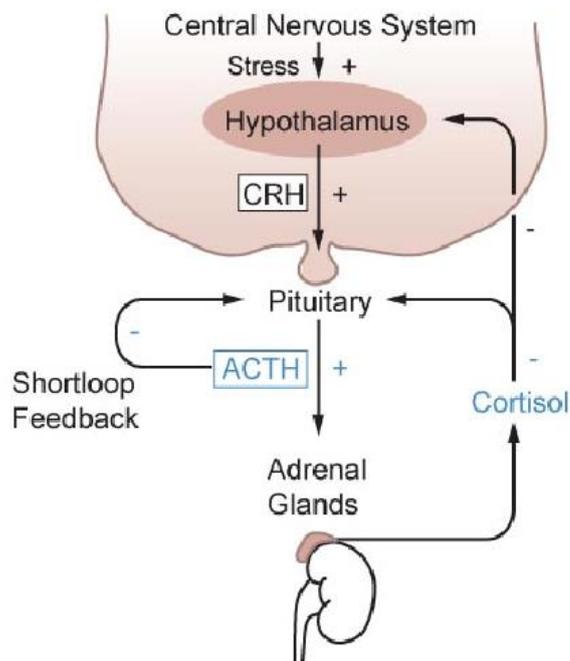


Figura 12. Liberação do cortisol pelas glândulas suprarrenais e mecanismos de retroalimentação.

Os glicocorticóides são usados na prática clínica em diferentes quadros patológicos. O seu efeito anti-inflamatório é usado em doenças como asma e artrite reumatoide e o seu efeito imunossupressor apresenta interesse terapêutico em doenças autoimunes como LUPUS e em transplante de órgãos (CZOCK *et al.*, 2005).

Os anti-inflamatórios esteróides reduzem a inflamação por vários mecanismos celulares e moleculares, nomeadamente através da redução da expressão de genes

induzidos por citocinas. Os glicocorticóides atravessam a membrana celular e ligam-se a um recetor esteróide citoplasmático, que sofre translocação para o núcleo onde reconhece sequências específicas de DNA. O maior efeito da ligação ao DNA do complexo glicocorticóide/recetor é inibir a ativação transcricional dos genes regulados por NF-kB e pela proteína ativadora 1(AP-1), nomeadamente os genes que codificam as proteínas COX-2 e iNOS (DINARELLO, 2010).

Os glicocorticóides são usados na prática clínica em diferentes quadros patológicos. O seu efeito anti-inflamatório é usado em doenças como asma e artrite reumatoide e o seu efeito imunossupressor apresenta interesse terapêutico em doenças autoimunes como LUPUS e em transplante de órgãos (CZOCK *et al.*, 2005).

Os anti-inflamatórios esteróides reduzem a inflamação por vários mecanismos celulares e moleculares, nomeadamente através da redução da expressão de genes induzidos por citocinas. Os glicocorticóides atravessam a membrana celular e ligam-se a um recetor esteróide citoplasmático, que sofre translocação para o núcleo onde reconhece sequências específicas de DNA. O maior efeito da ligação ao DNA do complexo glicocorticóide/recetor é inibir a ativação transcricional dos genes regulados por NF-kB e pela proteína ativadora 1(AP-1), nomeadamente os genes que codificam as proteínas COX-2 e iNOS (DINARELLO, 2010).

Os anti-inflamatórios esteróides também atuam induzindo a síntese de lipocortina e p11/calpactina que inibem a enzima fosfolipase A2, impedindo a produção de ácido araquidónico e, conseqüentemente, o efeito das enzimas cicloxigenases e lipoxigenases; concomitantemente ativa antagonistas dos recetores de IL-1 (ERRANTE *et al.*, 2015).

Como os glicocorticóides exercem os seus efeitos sobre quase todos os sistemas fisiológicos, clinicamente esses medicamentos estão associados a vários efeitos adversos graves, sendo alguns potencialmente fatais. Devido a estes fatos, o uso clínico de corticosteróides impõem uma reflexão cuidadosa da relação risco/benefício personalizada para cada paciente (SCHIMMER *et al.*, 2006) (Tabela 5).

Tabela 5. Complicações comuns decorrentes do uso sistêmico de corticosteroides. Adaptada de POETKER *et al.* (2010).

Efeitos adversos corticosteróides	Observações
Síndrome de <i>Cushing</i> ; Obesidade troncal; tecido adiposo facial e dorsocervical.	Incidência e dose requerida variável
Hiperglicemia	Valor de glicemia variável e não bem caracterizado
Infecções	Uso prolongado; múltiplos efeitos em leucócitos
Cicatrização de ferimentos	Reduz a fagocitose e produção de citocinas; atrasa a reepitelização, reduz a resposta de fibroblastos, proliferação capilar e inibe a síntese de colagênio.
Redução da densidade óssea e necrose avascular	Pode ocorrer poucos meses depois da sua administração; descrito para doses de 290 mg de prednisolona
Catarata e Glaucoma	Normalmente requer meses ou anos de uso; mais de 5% desenvolve aumento de pressão com semanas.
Equimoses, fragilidade epitelial	Normalmente reversível com a descontinuação
Úlcera péptica	Não há evidências conclusivas
Supressão da adrenal	Doses variadas
Efeitos cardiovasculares	Causas não esclarecidas
Psiquiátrico	<ul style="list-style-type: none"> - Efeitos de média intensidade têm incidência de 27.6 % (ansiedade, hipomania, insônia, letargia e irritabilidade); - Efeitos severos têm incidência de 5.7%: (mania, depressão e agressividade) .

1.3.3. Fármacos biológicos imunomoduladores

Algumas doenças inflamatórias crônicas podem ser classificadas como autoimunes ou auto-inflamatórias. As doenças autoimunes são caracterizadas por disfunção das células T, onde a auto reatividade é mantida por citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o interferão gama (IFN- γ) e a interleucina 23 (IL-23). São exemplos de doenças inflamatórias autoimunes a artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais e psoríase. As doenças auto-inflamatórias são causadas por disfunção em macrófagos, cujo mecanismo está ligado ao aumento da secreção de IL-1. São exemplos de doenças auto-inflamatórias a doença de *Behcet* e a doença multissistêmica inflamatória de início neonatal (NOMID, do inglês Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease) (DINARELLO, 2010).

Após décadas de estudo, os biofármacos apresentam-se com uma estratégia terapêutica atrativa para o tratamento dessas doenças. Existiam no mercado, até 2015, 18 fármacos biológicos imunomoduladores aprovados para doenças autoimunes e auto-inflamatórias. (Tabela 6). Os biofármacos anti-TNF e anti- IL-1 constituem a maioria dos imunomoduladores aprovados, sendo utilizados principalmente no tratamento de artrite reumatoide, esclerose múltipla e doenças gastrointestinais (OSTROV, 2015).

Tabela 6. Fármacos biológicos aprovados para doenças autoimunes e doenças auto-inflamatórias. (MAB: Anticorpo monoclonal; JAK: Janus Kinase, FAB: fragmento de Anticorpo; CTLA-4: antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos; RA: Artrite Reumatoide; AS: Espondilite Anquilosante; JIA: artrite idiopática juvenil; MS: Esclerose múltipla; PsA: Artrite psoriática; CAPS: Síndrome periódica associada à Criopirina; Blys: Estimulador de linfócito B; UC: Colite ulcerativa). Fonte: OSTROV (2015).

Medicamento	Uso clínico	Tipo	Alvo e mecanismos de ação
Abatacept	RA, JIA poliarticular	CTLA-4 bloqueador de co-estimulação	Inibição de CD28
Adalimumab	RA, Psoríase, AS, PsA, CrD, JIA	MAB humano	Inibidor de TNF α
Anakinra	RA, CAPS	Proteína recombinante	Recetor antagonista de IL-1
Belimumab	LUPUS	MAB humana	Inibidor de BlyS
Canakinumab	CAPS, JIA	MAB humana	Inibidor de IL-1 β
Certolizumab	RA, AS, PsA, CrD	FAB humanizado	Inibidor de TNF α
Etanercept	RA, JIA, Psoríase, PsA, AS	Proteína de fusão do Recetor	Antagonista solúvel do recetor de TNF- α
Golimumab	RA, Psoríase, AS, PsA, CrD, UC	MAB humana	Inibidor de TNF α
Infliximab	RA, AS, PsA, UC, CrD	MAB quimérica	Inibidor de TNF α
INF β 1a (Refib)	MS	Inibidor de citocina	Ligação a Recetores INF tipo 1
INF β 1b (Betaseron)	MS	Inibidor de citocina	Ligação a Recetores INF tipo 1
INF β 1a (Avonex)	MS	Inibidor de citocina	Ligação a Recetores INF tipo 1
Natalizumab	CrD, MS	MAB humanizada	Inibidor de integrina α -4
Rilonocept	CAPS	Proteína de fusão do recetor	Alvo do recetor heterodímero IL-1-R1/IL-RAcP
Rituximab	RA, ANCA associada a vasculite	MAB quimérica	Inibidor do recetor CD20 em células B
Tocilizumab	RA, JIA poliarticular e sistêmica	MAB humanizada	Inibidor do recetor IL-6
Tofacitinib	RA	Pequenas moléculas, inibidor de <i>Janus kinase</i>	Bloqueador específico da via JAK-STAT
Ustekinumab	Psoríase e CrD	MAB humanizada	Anticorpo anti-p40; células inibidoras Th1/Th17

1.3.3.1. Terapia anti-citocinas

A terapia anti-citocinas foi iniciada por Simon Skurkovich, em meados da década de 70, quando a partir da detecção de interferão em pacientes com doenças auto-imunes, Skurkovich propôs que sua neutralização poderia ter efeito terapêutico. Outro marco na terapia anti-citocina foi a demonstração, por BRUCE BEUTLER e colaboradores, em 1985, que a administração de anticorpos anti-TNF- α a ratos os protegia contra *sepsis* de origem bacteriana (TAYAL *et al.*, 2008).

As citocinas compõem a resposta imune inata e a sua inibição é uma estratégia terapêutica que tem sido alvo de estudo nos últimos anos. Embora a sua função primordial seja proteção do hospedeiro e reparo tecidual, estes mediadores estão envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças, constituindo, deste modo, alvos atrativos para terapia (DINARELLO, 2010).

As principais moléculas estudadas nos tratamentos anti-citocinas são TNF- α e IL-1, em parte, devido ao papel central que desempenham na disfunção de múltiplos órgãos induzida por endotoxemia. Vários estudos demonstram aumento na sobrevivência de modelos pré-clínicos de bacteremia *gram*-negativa e endotoxemia quando a atividade destas citocinas é bloqueada por anticorpos (ABRAHAM, 2002).

A terapia anti-TNF tem modificado o decurso de doenças como artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil (JIA) e doenças inflamatórias intestinais. Tem-se observado o aumento do número de pacientes em remissão clínica e redução em hospitalizações, especialmente quando usado em combinações com outros fármacos, nomeadamente o metotrexato para JIA e artrite reumatoide e a 6-mercaptopurina na doença de *Crohn*. O Bloqueio de IL-1 tem demonstrado efeito terapêutico em doenças como JIA e doença de *Still* iniciada em adultos (OSTROV, 2015).

Os agentes anti-citocina por suprimirem a imunidade estão relacionados com várias reações adversas. Cerca de 18% dos doentes tratados com infliximab ou etanercept apresentam infeções graves (KROESEN *et al.*, 2003) e em mais de 33% dos doentes tratados com etanercept foram detetadas reações (eritema, prurido, dor ou edema) no local da injeção (KRENSKY *et al.*, 2005).

1.3.3.2. Inibidores da via NF- κ B

A capacidade de controlar múltiplos genes envolvidos em doenças inflamatórias, doenças autoimunes e cancro, enfatizaram a relevância do fator de transcrição NF- κ B como um alvo terapêutico atrativo, conduzindo à identificação de inibidores desta via de sinalização (FRASER, 2006). Estão descritos mais de 700 inibidores do NF- κ B, alguns como inibidores gerais desta via, outros tendo como alvo uma etapa específica ou múltiplos alvos ao longo da via (GUPTA *et al.*, 2010) (Figura 13).

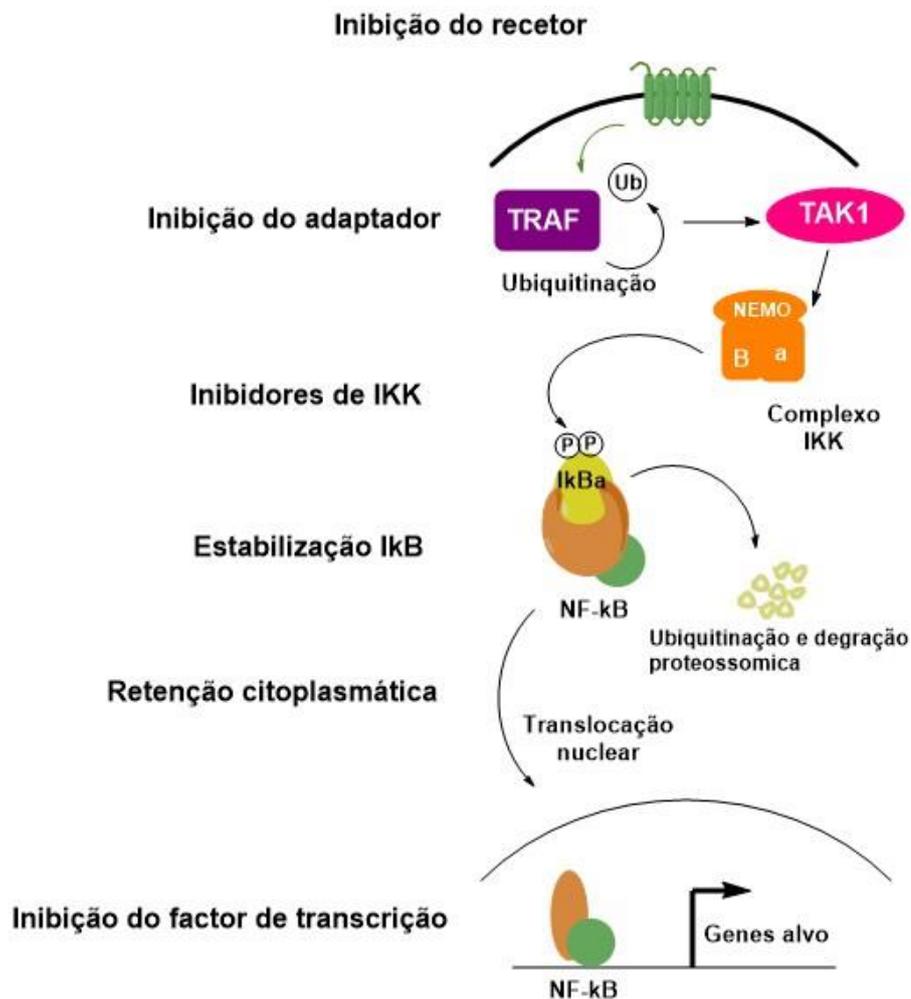


Figura 13. Estratégias para inibição da via de sinalização do NF- κ B. Fonte: GILMORE *et al.* (2010).

Existem muitas moléculas descritas na literatura capazes de modular o NF- κ B, no entanto, atuam geralmente sob condições específicas, como em modelos celulares, ou requerem doses elevadas para alcançarem o efeito supressor. Como consequência, apenas um número reduzido está atualmente a ser avaliado em ensaios clínicos (LIN *et al.*, 2014).

Os glicocorticóides e vários anti-inflamatórios não esteróides disponíveis no mercado modulam a atividade do NF- κ B, a aspirina, por exemplo, funciona como inibidor competitivo de IKK. No entanto, estes medicamentos não são específicos e requerem altas concentrações que induzem, simultaneamente, efeitos tóxicos (TAK *et al.*, 2001). Diversos estudos recentes visam identificar compostos que inibam seletivamente a via do NF- κ B. Um grande número de derivados de plantas têm demonstrado atividade inibitória sobre este fator de transcrição, incluindo ligninas, sesquiterpenos e polifenóis (NAM, 2006).

A maioria dos inibidores disponíveis da via do NF- κ B alvejam componentes do complexo IKK, uma vez que este desempenha um papel chave na regulação da via de sinalização em questão, além do reconhecido valor terapêutico de inibidores sintéticos das proteínas cinase (GILMORE *et al.*, 2010).

O bloqueio da atividade do NF- κ B em modelos de doenças inflamatórias, autoimunes e oncológicas *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado benefício terapêutico no controlo dessas doenças, apesar dos potenciais efeitos adversos relacionados com a forte inibição de NF- κ B (HAYDEN *et al.*, 2012). De fato, o NF- κ B é requerido para diversas funções constitutivas das células, nomeadamente resposta a estímulos, proliferação celular e morte celular, regulação da comunicação entre células, bem como ligação com outras vias de sinalização intracelular. Deste modo, a inibição do NF- κ B poderá estar associada a efeitos adversos, como supressão imunológica e dano tecidual (FRASER, 2006).

A otimização de parâmetros farmacocinéticos pode alterar o nível e a duração da inibição do fator de ativação nuclear NF- κ B e, conseqüentemente controlar respostas imunes e apoptóticas (FRASER, 2006). Para HAYDEN *et al.* (2012):

"As pesquisas começam a focar-se em seletivas funções de NF- κ B e membros da família I κ B, e à medida que progredimos em direção a uma melhor compreensão dos mecanismos que regem a ativação de IKK em contextos patológicos, o optimismo do passado e ambivalência atual sobre a utilidade terapêutica do bloqueio NF- κ B será substituído por sucessos terapêuticos do mundo real".

Diante da gravidade e extensão das doenças inflamatórias e os efeitos adversos relacionados com o uso dos anti-inflamatórios disponíveis no mercado, urge a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios potentes e com reduzidos efeitos adversos.

2. Compostos fenólicos

2.1. Fármacos de origem natural

A humanidade sempre recorreu às plantas para o tratamento das suas enfermidades. Ao longo da história adquiriu-se um conhecimento empírico acerca da toxicidade e atividade dos produtos naturais (PN), conhecimento este que foi perpetuado ao longo das gerações e está atualmente presente tanto na medicina tradicional quanto na medicina clássica (PROENÇA DA CUNHA *et al.*, 2009).

Os PNs foram responsáveis pela maior fonte de diversidade química usada como matéria-prima na descoberta de fármacos ao longo do último século. Muitos PNs e produtos naturais modificados por síntese têm sido desenvolvidos com sucesso para o uso clínico no tratamento de doenças humanas em quase todas as áreas (BAKER *et al.*, 2007).

Os produtos naturais podem ser classificados em 3 grupos: PNs, PNs semi-sintéticos, ou derivados de PNs. PNs semi-sintéticos são compostos derivados a partir de um produto natural usando semi-síntese, enquanto os derivados de PN são compostos sinteticamente derivados, ou em alguns casos, inspirados em produtos naturais modelos (BUTLER, 2008).

Os produtos naturais representam uma importante fonte de medicamentos (BAKER *et al.*, 2007). Aproximadamente 25% dos fármacos prescritos em todo o mundo tem origem vegetal; 11% dos medicamentos classificados como essenciais

pela organização mundial de saúde advêm exclusivamente de plantas; e um número significativo de fármacos sintéticos são obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001). São exemplos de fármacos de origem natural usados pelo homem: aspirina, morfina, digoxina e pilocarpina (BUTLER, 2004).

A investigação de produtos naturais como fonte de medicamentos para uso humano teve maior expressão na indústria farmacêutica ocidental no período de 1970 a 1980, o que resultou em um cenário farmacêutico fortemente influenciado por moléculas não sintéticas (KOEHN *et al.*, 2005). O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos pode ser dividido em duas grandes fases: pré-clínica e clínica (Figura 14).

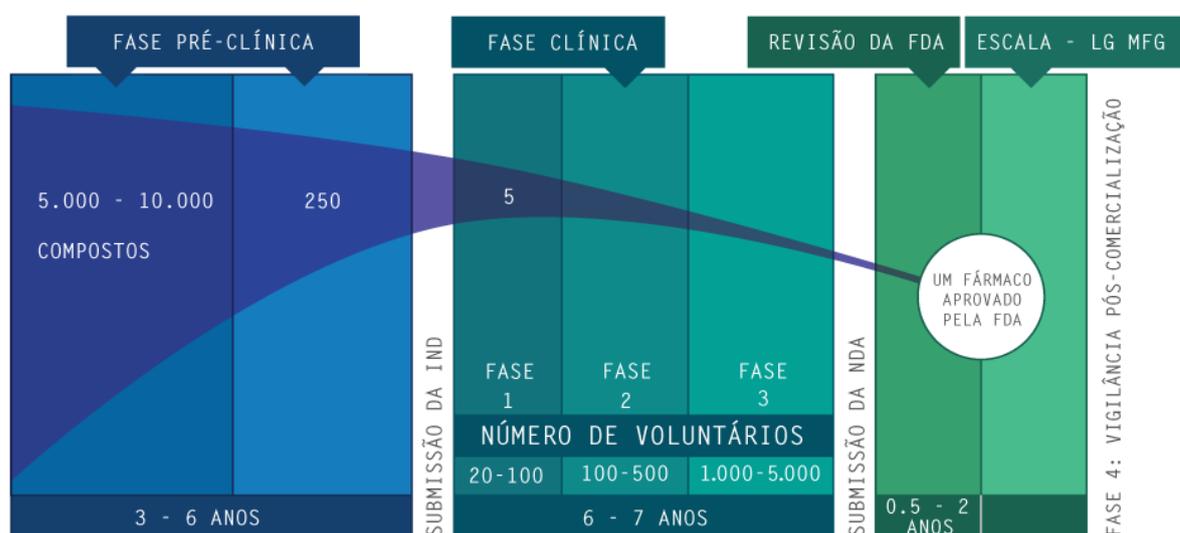


Figura 14. Etapas dos processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, desde a fase pré-clínica até aprovação pelas entidades reguladoras.

No processo de desenvolvimento de fármacos, as moléculas bioativas podem ser identificadas por triagens *in vitro* (biológicas, bioquímicas) ou por técnicas *in silico* a partir de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias (GUIDO *et al.*, 2010, MONTANARI *et al.*, 2001). As moléculas identificadas nas fases iniciais geralmente apresentam baixa potência e afinidade pelo alvo, no entanto, modificações estruturais ao longo do processo melhoram suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, originando os chamados compostos *lead*. Ao final da fase pré-clínica são selecionadas as moléculas candidatas a fármacos,

conhecidas como novas entidades químicas (NCEs, do inglês, New Chemical Entities) (GUIDO *et al.*, 2010).

Considerando o processo de desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais, inicialmente o PN é extraído a partir da fonte, concentrado, fracionado e purificado, gerando essencialmente uma única substância biologicamente ativa. O processo de identificação estrutural, facilitado por técnicas espectroscópicas modernas, pode identificar estruturas novas ou compostos já conhecidos. Quando moléculas potentes e selectivas são identificadas, estudos preliminares de relação estrutura-atividade (SAR) são conduzidos e o processo de purificação é aumentado. A partir do momento em que uma modificação estrutural possibilita a modulação da resposta biológica, o composto *hit* é declarado como um composto *lead* e prossegue para otimizações adicionais pela química medicinal tradicional (KOEHN *et al.*, 2005) (Figura 15).

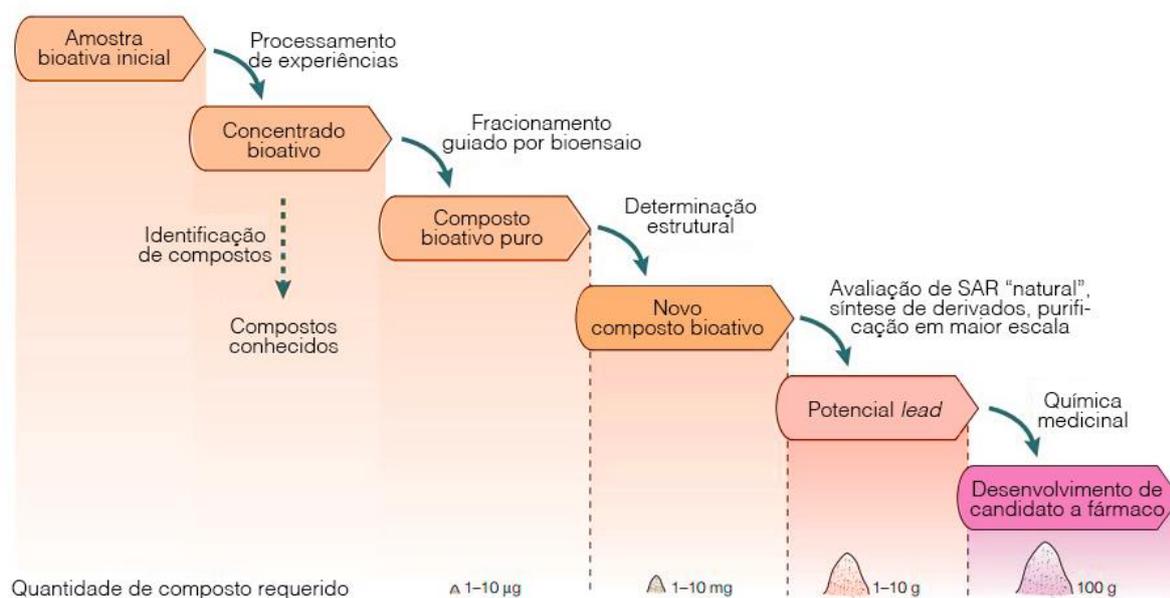


Figura 15. Processo químico para a descoberta do produto natural (KOEHN *et al.*, 2005).

Depois da fase pré-clínica, as moléculas serão avaliadas pelas entidades reguladoras relativamente à possibilidade de execução de ensaios clínicos; se aprovadas, será emitida uma licença para investigação deste novo candidato a fármaco (SALUM, 2007). Nas fases clínicas são determinadas a eficácia, segurança e

posologia das NCEs em humanos; no final dessas fases o candidato a fármaco é submetido novamente à entidade reguladora para a requerer a sua aprovação (NDA, do inglês New Drug Approval). Após todas essas etapas, que duram de 10 a 15 anos, o fármaco pode ser comercializado (SALUM, 2007).

A principal fonte de fármacos em plantas é o metabolismo secundário, responsável por produzir estruturas diversas e complexas. Químicos e farmacêuticos demonstram interesse nesses compostos desde longa data e têm investigado extensivamente as suas propriedades químicas desde a segunda metade do século XIX (HUSSAIN *et al.*, 2012).

2.2. Metabolitos secundários

O metabolismo das plantas é didaticamente dividido em duas classes: metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário, comum a todos os vegetais, permite o uso de água, dióxido de carbono e minerais para o desenvolvimento de metabolitos responsáveis pela manutenção celular como açúcar, ácidos gordos, aminoácidos e ácidos nucleicos. O metabolismo secundário gera compostos químicos requeridos para a interação planta-meio e distribuem-se diferencialmente entre os grupos taxonômicos do reino vegetal (KLIEBENSTEIN, 2013).

Os compostos que hoje conhecemos como metabolitos secundários foram erroneamente definidos em 1891 como materiais com relativa irrelevância na fisiologia global dos vegetais (BENTLEY, 1999). O termo "secundário" para esses metabolitos de plantas foi introduzido por Czapek em 1925, pois para o autor esses compostos derivavam do metabolismo do nitrogênio, por ele chamado de modificações estruturais secundárias (BOURGAUD *et al.*, 2001).

SEIGLER em 1977 no seu artigo intitulado *Primary Roles for Secondary Compounds*, expõe diferentes visões dos papéis dos metabolitos secundários na época:

“Alguns encontraram que os compostos secundários não têm função [...] ou têm sugerido que eles são resultado de desintoxicação. [...] outros expressam a opinião de que estes compostos estão envolvidos na defesa da planta contra animais, fungos, bactérias e outras plantas” (SEIGLER, 1977).

A partir de meados do século XX, avanços tecnológicos na área da cromatografia induziram a descoberta de muitos metabolitos secundários, levando ao estabelecimento da fitoquímica enquanto disciplina. O aperfeiçoamento de técnicas bioquímicas e o crescimento da biologia molecular permitiram que se chegasse aos conceitos atuais de metabolitos vegetais (BOURGAUD *et al.*, 2001).

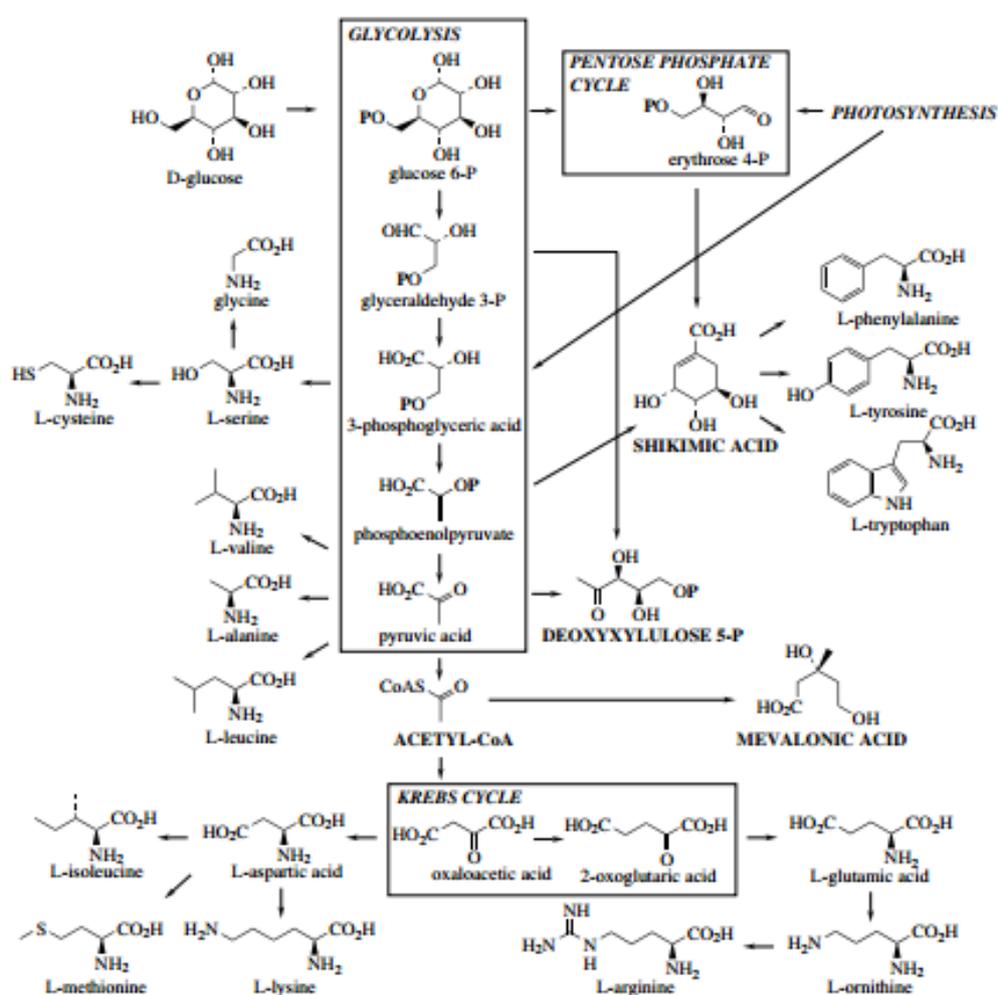


Figura 16. O acetil-CoA tem origem na via glicolítica e na oxidação de ácidos gordos. O Shiquimato é produzido pela combinação de fosfoenolpiruvato, um intermediário da via glicolítica e eritrose 4-fosfato a partir da via da pentose fosfato. O ácido mevalônico é formado por 3 moléculas de acetil-CoA. Deoxixilulose-fosfato surge a partir da combinação de dois intermediários da via glicolítica, o ácido pirúvico e o gliceraldeído-3-fosfato. Fonte: DEWICK (2002).

As reações biossintéticas responsáveis tanto pelo metabolismo primário quanto secundário, consomem energia liberada na glicólise de hidratos de carbono e do ciclo do ácido cítrico (KABERA *et al.*, 2014). Os blocos construtores para o metabolismo secundário são derivados do metabolismo primário (DEWICK, 2002) (Figura 16).

Ao longo da evolução, diferentes linhagens de plantas desenvolveram vias metabólicas secundárias específicas, que se destinavam a responder a necessidades características (PICHERSKY *et al.*, 2000). São funções dos metabolitos secundários: interações das plantas com polinizadores e fungos micorrizos; atração de predadores de herbívoros; sinalização planta-planta e proteção contra stresses abióticos como a radiação UV-B, geada e seca (MOORE *et al.*, 2014).

O reino vegetal apresenta sistemas que regulam a produção de metabolitos secundários para otimizar os seus benefícios em detrimento do custo energético intrínseco à sua biossíntese. Desse modo, muitos compostos relacionados com a defesa são sintetizados apenas em resposta a agentes patogénicos ou insetos; e alguns metabolitos só estão presentes em determinados tecidos ou fases do desenvolvimento dos vegetais (KLIEBENSTEIN, 2013).

A figura 16 mostra como os intermediários metabólicos dos processos de fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs são retirados dos processos que geram energia para fornecer intermediários biossintéticos. Os mais importantes blocos construtores empregados na biossíntese de metabolitos secundários são a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), ácido shiquímico, ácido mevalônico e 1-deoxilulose 5- fosfato (DEWICK, 2002).

Os metabolitos secundários podem ser classificados de diferentes formas: (1) características químicas (por exemplo Flavonóides, cumarinas, quinolona); (2) planta de origem (Por exemplo, alcalóides do ópio, glicosídeos digitálicos); (3) origem biossintética que divide estes metabolitos em três grupos principais: terpenóides, alcalóides e fenólicos (VERPOORTE, 2000) (Figura 17).

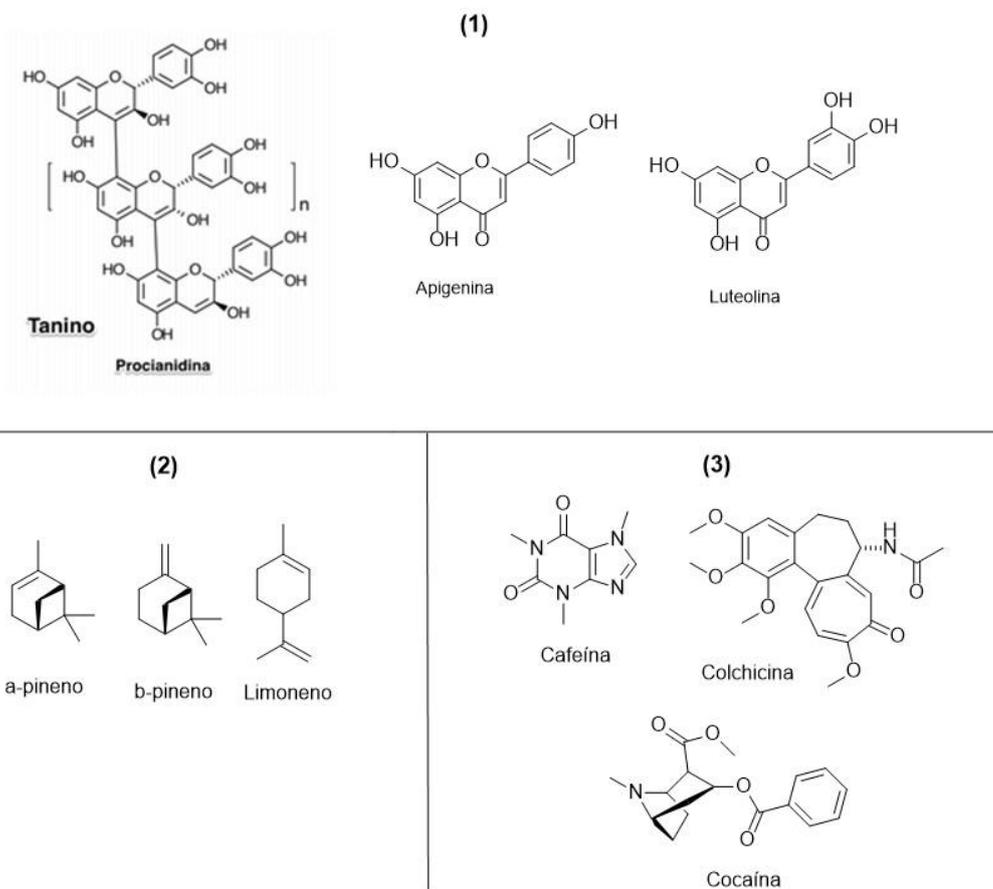


Figura 17. Exemplos de compostos dos três principais grupos de metabolitos secundários, de acordo com sua origem biossintética. (1) Polifenóis, (2) Terpenóides, (3) Alcalóides.

Os terpenóides constituem uma grande família que compartilha poucas características estruturais e funcionais. Esteróides, carotenóides e óleos essenciais são exemplos desse grupo de compostos. Derivam da polimerização do isopreno e são sintetizados a partir da via do mevalonato e da via do deoxixilulose-fosfato. São classificados segundo o número de unidades de 5 carbonos em: monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), entre outros (KABERA *et al.*, 2014).

Os alcalóides são compostos básicos sintetizados por organismos vivos contendo um ou mais átomos de nitrogênio heterocíclicos. Salvo algumas exceções, são derivados de aminoácidos e farmacologicamente ativos. São exemplos de alcalóides: morfina, ópio, mescalina e nicotina (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza, caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos ligados. São formados a partir da via do shiquimato, acetato e

ácido mevalônico. São exemplos os flavonóides e os taninos (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012).

A seguir serão considerados apenas os compostos polifenólicos, pois é a classe de metabolitos secundários usada no âmbito do desenvolvimento do presente trabalho.

2.3. Os compostos polifenólicos e sua classificação

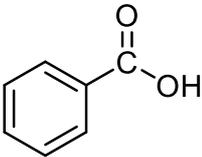
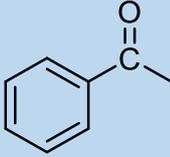
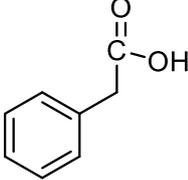
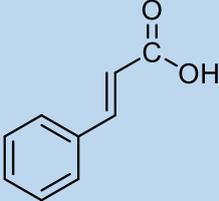
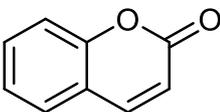
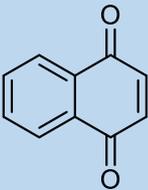
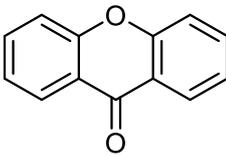
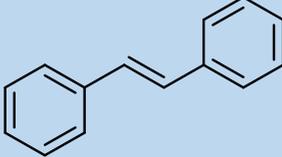
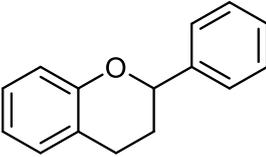
Ancestrais gregos (800 - 500 a.C.) desenvolveram a técnica de conversão da pele animal em couro a partir do uso de taninos presentes em galhos de carvalho. Devido ao uso recorrente de extratos de plantas para esse fim, os polifenóis derivados de plantas foram por muito tempo chamados de "taninos vegetais" (QUIDEAU *et al.*, 2011).

Em 1957, o químico industrial Theodore White classificou, pela primeira vez, os taninos como compostos fenólicos. Os polifenóis começaram então a ser categorizados como estruturas que não estavam necessariamente relacionadas com a capacidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas a partir de soluções (QUIDEAU *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos podem variar de estruturas simples, compostas por um único anel aromático, a grandes e complexos taninos. Podem ser divididos em muitas classes de acordo com o número de anéis fenólicos que eles contêm e os elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros. Estão comumente conjugados a açúcares e ácidos orgânicos. Os principais grupos de polifenóis são: flavonóides, ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, estilbenos e ligninas (CROZIER *et al.*, 2009, D ARCHIVIO *et al.*, 2007) (Tabela 7).

Ubiquamente presentes nas plantas, os polifenóis são os metabolitos secundários com maior distribuição no reino vegetal. Tais estruturas são incomuns em bactérias, fungos e algas (CHEYNIER *et al.*, 2013). Nos vegetais, desempenham funções como crescimento, pigmentação, polinização, resistência contra agentes patogênicos, predadores e radiação solar (FRAGA *et al.*, 2010).

Tabela 7. Esqueleto estrutural básico de compostos fenólicos. Adaptado de CROZIER *et al.* (2009).

Esqueleto	Classificação	Estrutura Básica
C6 - C1	Ácidos Fenólicos	
C6 - C2	Acetofenonas	
C6 - C2	Ácido Fenilacético	
C6 - C3	Ácidos Hidroxinâmicos	
C6 - C3	Cumarinas	
C6 - C4	Naftoquinonas	
C6 - C1 - C6	Xantonas	
C6 - C2 - C6	Estilbenos	
C6 - C3 - C6	Flavonóides	

São fontes ricas de compostos fenólicos frutas como o mirtilo, quivi, morango, maçã, amora e uva; vegetais como chicória, batata, alcachofra, brócolos e feijão verde; outros tipos de alimentos como chá, chocolate e vinho (MANACH *et al.*, 2004). Existem mais de 8000 diferentes estruturas de polifenóis relatadas, das quais mais de 4000 são do tipo flavonóide (FRAGA *et al.*, 2010).

Diversos efeitos benéficos a longo prazo para a saúde humana têm sido relacionados com a ingestão de frutas e verduras ricas em polifenóis, nomeadamente a redução de patologias crónicas e degenerativas, como a obesidade, síndrome metabólica, diabetes, cancro, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares (ALAM *et al.*, 2014, APPEL *et al.*, 1997, FRAGA *et al.*, 2010, IQBAL *et al.*, 2008, LIU *et al.*, 2000, MURSU *et al.*, 2008, PERRETTI, 2015, QUIDEAU *et al.*, 2011).

Um dos mecanismos moleculares associados ao efeito preventivo dos polifenóis nas patologias acima referidas consiste na sua atividade antioxidante. Esta função está relacionada com a estrutura química dos mesmos. Aqueles com uma estrutura *orto*-di-hidroxilada (porção catecol) e capacidade de deslocalizar electrões desemparelhados apresentam essa atividade mais evidente (CROFT, 2016) (Figura 18).

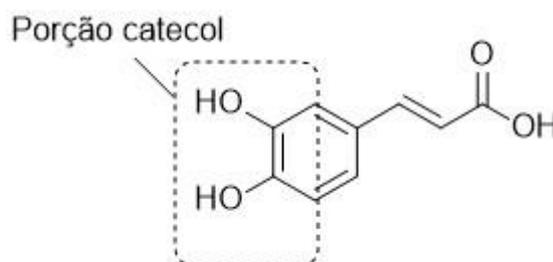


Figura 18. O ácido cafeíco é uma exemplo de polifenol que contém uma porção catecol.

No entanto, apesar da comprovada atividade antioxidante desses compostos *in vitro*, muitos estudos bem controlados e com marcadores validados de dano oxidativo têm falhado na demonstração de qualquer acção antioxidante dos polifenóis *in vivo* (HALLIWELL *et al.*, 2005). A *International Life Sciences Institute Europe* considera que os efeitos antioxidantes diretos de polifenóis *in vivo* não estão bem estabelecidos, devido à baixa concentração sistémica desses compostos após a sua absorção e metabolismo (CROFT, 2016, HOLLMAN *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que os mecanismos não específicos, como acção antioxidante, requerem altas concentrações de polifenóis e são restritos ao tracto gastrointestinal (TGI) e, eventualmente, ao meio vascular (FRAGA *et al.*, 2010, HALLIWELL *et al.*, 2000). Evidências mostram que os polifenóis podem atuar na redução de doenças do TGI incluindo o cancro (ASFAR *et al.*, 2003, AUGUST *et al.*, 1999, HONG *et al.*, 2001, SCHWARTZ *et al.*, 2005).

Um ensaio clínico de fase I, desenvolvido por AUGUST e colaboradores (1999), avalia a ingestão de chá verde como agente quimiopreventivo colo-rectal, e conclui que o mesmo inibe a síntese de PGE₂ em indivíduos saudáveis e que pode ser encaminhado para um estudo clínico de fase II. O chá verde contém uma ampla variedade de polifenóis, dos quais os flavonóis são os maiores representantes. Não se sabe ao certo quais compostos são responsáveis pela atividade anti-tumoral do chá verde, mas acredita-se que esteja relacionada principalmente aos polifenóis (AUGUST *et al.* (1999)

Um outro estudo feito com chá verde e chá preto em tecidos do cólon normais e com tumor, mostra que a produção de PGE₂ é inibida em células normais e tumorais após o tratamento com chá verde, enquanto o chá preto pode aumentar a produção de PGE₂ em células do cólon que contêm COX-2 (HONG *et al.*, 2001).

Há fortes evidências de que não são apenas as propriedades redox dos polifenóis as responsáveis pelos efeitos protectores contra doenças. Os mecanismos envolvidos nas acções fisiológicas desses compostos podem estar relacionados com a habilidade dos mesmos se ligarem a proteínas específicas (QUIDEAU *et al.*, 2011). São descritos na literatura, para esses compostos, o bloqueio de recetores, como o recetor de interleucina e recetores *toll like* (TLR-4), bem como o bloqueio de fatores de transcrição que induzem a expressão de genes pró-inflamatórios, como o NF-κB, AP-1 e a cinase do terminal amínico da proteína c-Jun (JNK) (JOSEPH *et al.*, 2015). JOSEPH e colaboradores (2015), num artigo de revisão sobre o efeito anti-inflamatório dos polifenóis em humanos, conclui que uma dieta rica em polifenóis a partir de frutas e seus derivados é eficaz na melhoria do stresse inflamatório a curto e longo prazo.

De um modo geral, os polifenóis são pouco absorvidos pelo intestino, altamente metabolizados e rapidamente eliminados. Os metabolitos encontrados no sangue e órgãos alvo são resultantes da digestão ou atividade hepática e podem diferir do composto original em termos de atividade biológica (MANACH *et al.*, 2004).

Diferentes classes de polifenóis apresentam diferentes formas de metabolização e absorção. As concentrações plasmáticas dos diferentes compostos analisados na revisão feita por Manach e colegas (2005) variam entre 0 a 4 $\mu\text{mol/L}$ considerando uma ingestão de 50 mg da aglicona equivalente, e a excreção urinária varia de 0,3% a 43% da dose ingerida. O ácido gálico e isoflavonas são os polifenóis mais bem absorvidos, seguidos das catequinas, flavononas e glicosídeos da quercitina. Os polifenóis menos absorvidos são as proantocianidinas, algumas catequinas e antocianinas. Os dados são ainda muito limitados para os ácidos hidroxinâmicos e outros polifenóis (MANACH *et al.*, 2005).

No processo digestivo, a primeira etapa é a libertação dos polifenóis da matriz. A clivagem de açúcares e polímeros e a hidrólise de ésteres de ácidos fenólicos são, para a maior parte dos compostos, um pré-requisito para a absorção através da barreira intestinal (KEMPERMAN *et al.*, 2010). Agliconas, monómeros, dímeros ou trímeros de flavonóis e alguns glicosídeos intactos podem ser absorvidos por enterócitos, geralmente por difusão passiva. Durante a absorção intestinal e passagem pelo fígado, os polifenóis sofrem extensa glucuronidação e/ou sulfatação (metabolismo de fase II), enquanto o metabolismo de fase I (reação de oxidação/redução) é pouco expressivo (KEMPERMAN *et al.*, 2010) (Figura 19).

As próximas seções deste trabalho abordam os flavonóides e estilbenos glicosilados, nomeadamente a rutina, naringina e polidatina, uma vez que correspondem à classe de compostos fenólicos estudados neste trabalho.

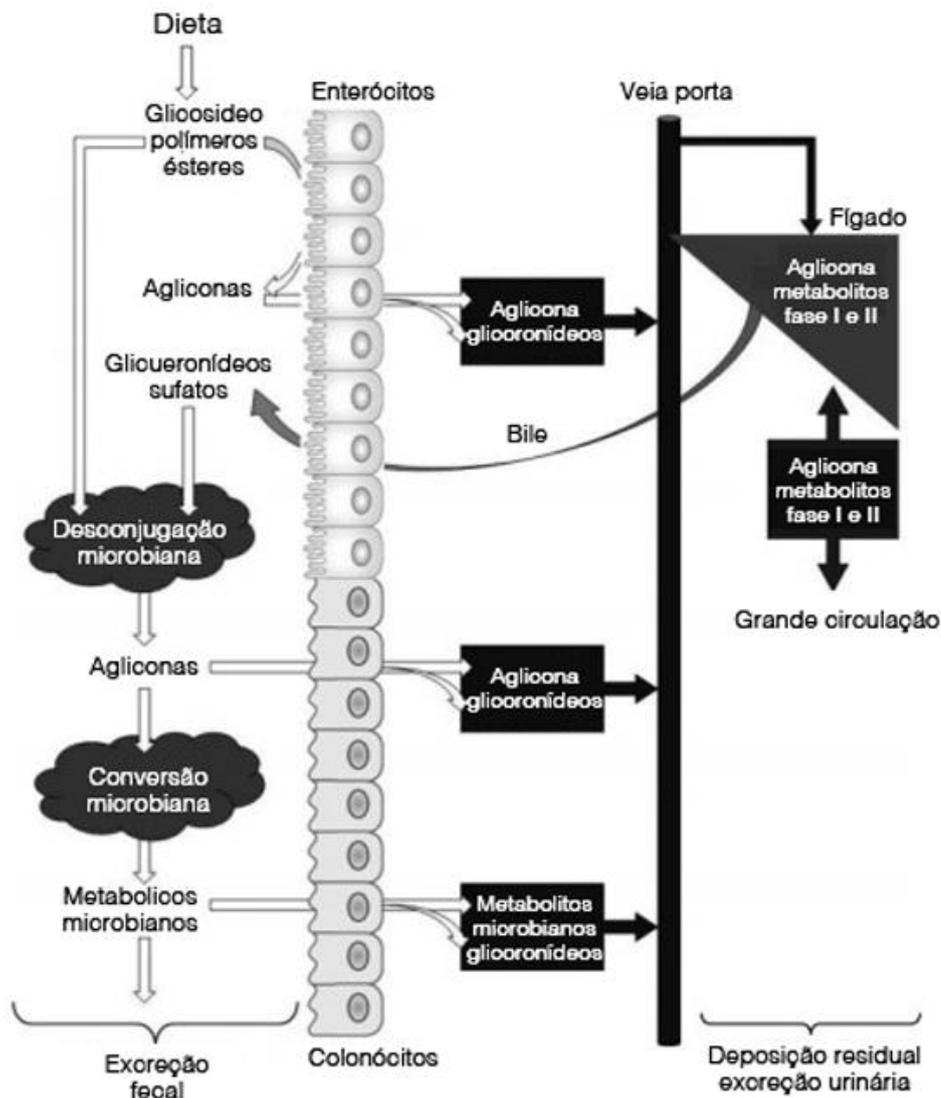


Figura 19. Absorção e metabolismo de polifenóis. Adaptado de KEMPERMAN e colaboradores (2010).

2.4. Flavonóides glicosilados

Com mais de 4500 representantes conhecidos, os flavonóides constituem a maior classe de produtos fenólicos vegetais. Estão presentes na maioria dos tecidos, principalmente em vacúolos (CROTEAU *et al.*, 2000). São descritos como polifenóis que contêm 15 átomos de carbono com dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por uma ponte de três átomos de carbono (que geralmente forma um terceiro anel chamado anel C) (VERPOORTE, 2000) (Figura 20).

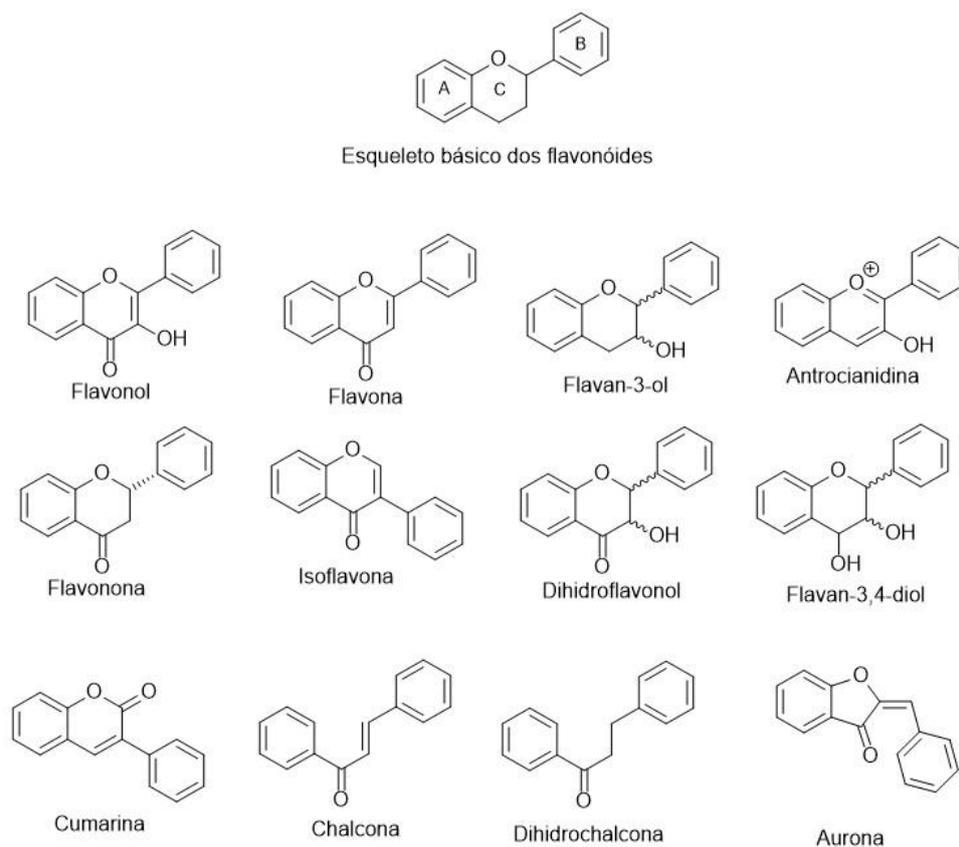


Figura 20. Estrutura geral dos flavonóides e esqueleto básico de suas subclasses. Adaptado de CROZIER *et al.* (2009).

O esqueleto básico dos flavonóides pode ter numerosos substituintes. Grupos hidroxilo estão geralmente presentes nas posições 4, 5 e 7. A maioria dos flavonóides existe sob a forma de glicosídeos. Tanto açúcares quanto grupos hidroxilos aumentam a solubilidade em água dos flavonóides, enquanto outros substituintes como grupos metil e unidades isopentil os tornam mais lipofílicos (CROZIER *et al.*, 2009). Os flavonóides são sintetizados a partir da fenilalanina como parte da via fenilpropanóide (VERPOORTE, 2000).

As principais subclasses de flavonóides contidos na dieta são flavonóis, flavonas, flavan-3-ols, antocianidinas, flavononas e isoflavonas; algumas subclasses estão presentes em menor número na dieta, nomeadamente diidroflavonóides, flavan-3,4-diols, cumarinas, chalconas, diidrochalconas e auronas (CROZIER *et al.*, 2009) (Figura 20).

Muitas interações entre plantas e animais são efetuadas por flavonóides. As antocianinas são os principais compostos que dão cor a flores e frutos, funcionando

como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes; o kaempferol já foi descrito como protector contra radiações UV; os taninos adicionam o gosto amargo e adstringência em certos tecidos da planta afastando insetos como formigas; a luteonina e apiginina servem como sinalizadores para bactérias fixadoras de nitrogénio; e os isoflavonóides podem atuar na defesa contra infeções fúngicas (CROTEAU *et al.*, 2000).

Os flavonóides existem na natureza geralmente na forma de O-glicosídeo ou C-glicosídeo. Os açúcares aos quais estão ligados incluem a glicose, galactose, ramnose, arabinose e rutinose (XIAO *et al.*, 2014b). A biotransformação de flavonóides agliconas em glicosídeos tem um papel crucial na biossíntese dos flavonóides. A glicosilação aumenta a solubilidade e estabilidade relativamente a aglicona (XIAO *et al.*, 2014b).

A capacidade antioxidante dos flavonóides está intimamente relacionada com o número e arranjo dos grupos hidroxilo ligados aos anéis fenólicos. Dentro das modificações estruturais, aquelas que alteram o número de hidroxilos no anel B têm maior influência na captação de espécies reativas de oxigénio. Os flavonóides têm habilidade de captar radicais livres pela doação directa de átomos de hidrogénio (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2011) (Figura 21).

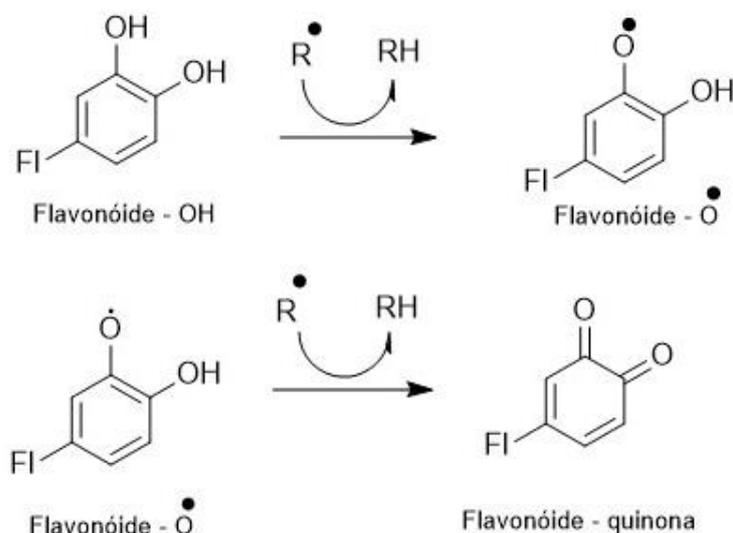


Figura 21. Captação de espécies reativas de oxigénio por flavonóides. O radical livre Flavonóide-O• pode reagir com o segundo radical, gerando uma estável estrutura quinona. Fonte: PROCHÁZKOVÁ *et al.*, (2011).

Os flavonóides podem atuar como agentes antioxidantes, não apenas através da captação directa de radicais, como também através da ativação de enzimas antioxidantes, quelação de metais, inibição de oxidases, redução de radicais α -tocoferol, redução da produção de NO, entre outros (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2011).

Segundo estudos realizados com macrófagos RAW 264.7, a O-glicosilação de flavonóides reduz significativamente o seu potencial de inibição contra a produção de NO, expressão de iNOS e ativação do NF-kB (KIM *et al.*, 2013, KIM *et al.*, 2008). No entanto, segundo o estudo de revisão feito por XIAO (2015), a partir de estudos *in vivo*, e após administração oral, os flavonóides glicosídicos demonstram similar ou superior atividade anti-diabética, anti-inflamatória, anti-stresse e anti-alérgica relativamente a suas agliconas.

O destino biológico dos flavonóides glicosilados na dieta é controverso (WALLE, 2004, XIAO *et al.*, 2014a). Em geral, assume-se que a hidrólise do açúcar conjugado ao flavonóide é um pré-requisito para sua absorção (WALLE, 2004).

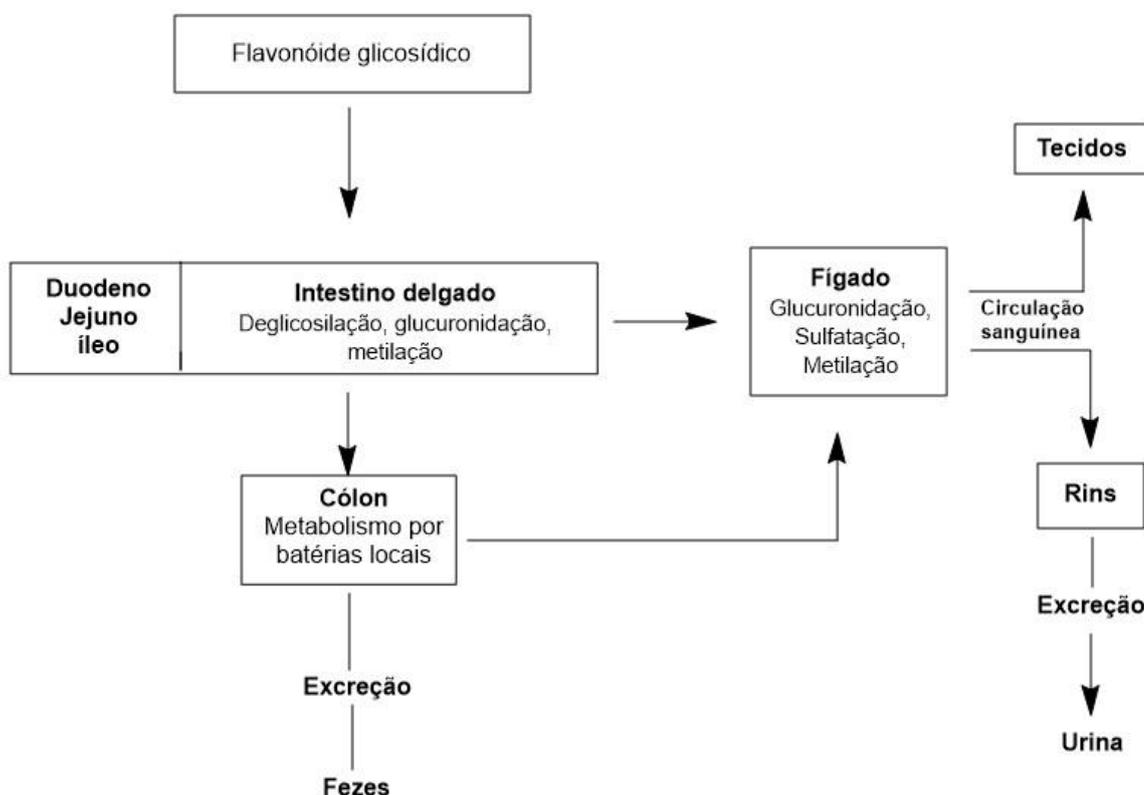


Figura 22. Fluxograma do metabolismo e absorção de flavonóides. Fonte: RICE-EVANS (2001).

Flavonóides glicosilados apresentam alta solubilidade e baixa permeabilidade. A absorção depende principalmente da permeabilidade, sendo que geralmente os flavonóides glicosilados não apresentam lipossolubilidade suficiente para atravessar a membrana celular. Por outro lado, as agliconas são mais hidrofóbicas e podem ser absorvidos mais facilmente pelas células epiteliais através de difusão passiva (XIAO, 2015) (Figura 22).

2.4.1. Rutina

A rutina (3,4,5,7-tetrahidroxiflavona-3-rutinosídeo) também conhecida como quercetina-3-rutinosídeo ou vitamina P, é um flavonóide glicosídico de tipo flavonol, cuja aglicona correspondente é a quercitina (Figura 23). Estima-se que aproximadamente 3-80 mg de flavonóides são consumidos diariamente, dos quais a quercitina representa 50-75% do total ingerido (CHUA, 2013).

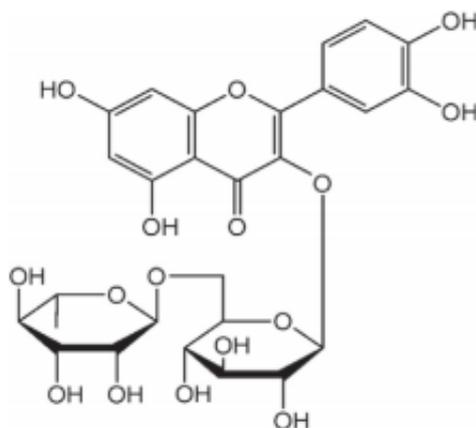


Figura 23. Estrutura química da rutina.

Os flavonóis são os flavonóides com maior distribuição em alimentos. São particularmente encontrados em cebolas, vegetais, bagas, vinho e chá. Glicosídeos da quercitina a partir de glicose, a rhamnose ou a rutinosídeo são a forma mais abundante de flavonóis, sendo a rutina o mais comum desses glicosídeos (AMARETTI *et al.*, 2015).

O trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) é considerado a maior fonte natural de rutina. Outras grandes fontes comerciais de rutina são *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), *Sophora japonica* L. (Fabaceae), *Maranta leuconeura* E. Morren (Marantaceae), *Orchidantha maxillarioides* (Ridl.) Schum (Lowiaceae), *Strelitzia reginae* Banks ex Aiton (Strelitziaceae), *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae), *Canna indica* L. (Cannaceae), *Canna edulis* Ker Gawl. (Cannaceae) and *Labisia pumila* (Blume) Mez (Primulaceae) (CHUA, 2013).

A biossíntese da rutina ocorre através da via sintética dos flavonóides. Inicia-se com a formação de fenilalanina a partir de fenilpiruvato. A fenilalanina é transformada em ácido trans-cinâmico, que sofre hidrólise para ácido p-cumarínico (C-9). O ácido C-9 condensa-se com 3 unidades malonil- coA (C-2) para formar uma chalcona. Reações sequenciais, catalisadas por enzimas, acabam por originar compostos, como 3-hidroxi flavonóides (catequinas) e 3,4-diol flavonóides (flavonóis) (AHERNE *et al.*, 2002) (Figura 24).

Uma ampla variedade de propriedades farmacológicas da rutina tem sido explorada na medicina humana e na nutrição. Empiricamente, é usada como agente antimicrobiano, antifúngico e antialérgico (AL-DHABI *et al.*, 2015). Contudo, pesquisas atuais têm demonstrado múltiplos benefícios farmacológicos para o tratamento de várias doenças crônicas como cancro (GUON *et al.*, 2016, PERK *et al.*, 2014), diabetes (HOSSEINZADEH *et al.*, 2014), hipertensão (KAUR *et al.*, 2016, MENDES-JUNIOR *et al.*, 2013) e hipercolesterolemia (KAMADA *et al.*, 2005, KAWAI *et al.*, 2008).

Muitos estudos revelam que a rutina tem atividade anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (AZEVEDO *et al.*, 2013). Existem cerca de 130 registros de preparações medicinais terapêuticas contendo rutina em suas formulações (CHUA, 2013). Um exemplo é o 'oxerrutinas' ou 'hidroxietilrutósídeos', usado na insuficiência venosa crônica, constituído de uma mistura de flavonóides semi-sintéticos obtidos a partir de hidroxilações da rutina (AZIZ *et al.*, 2015).

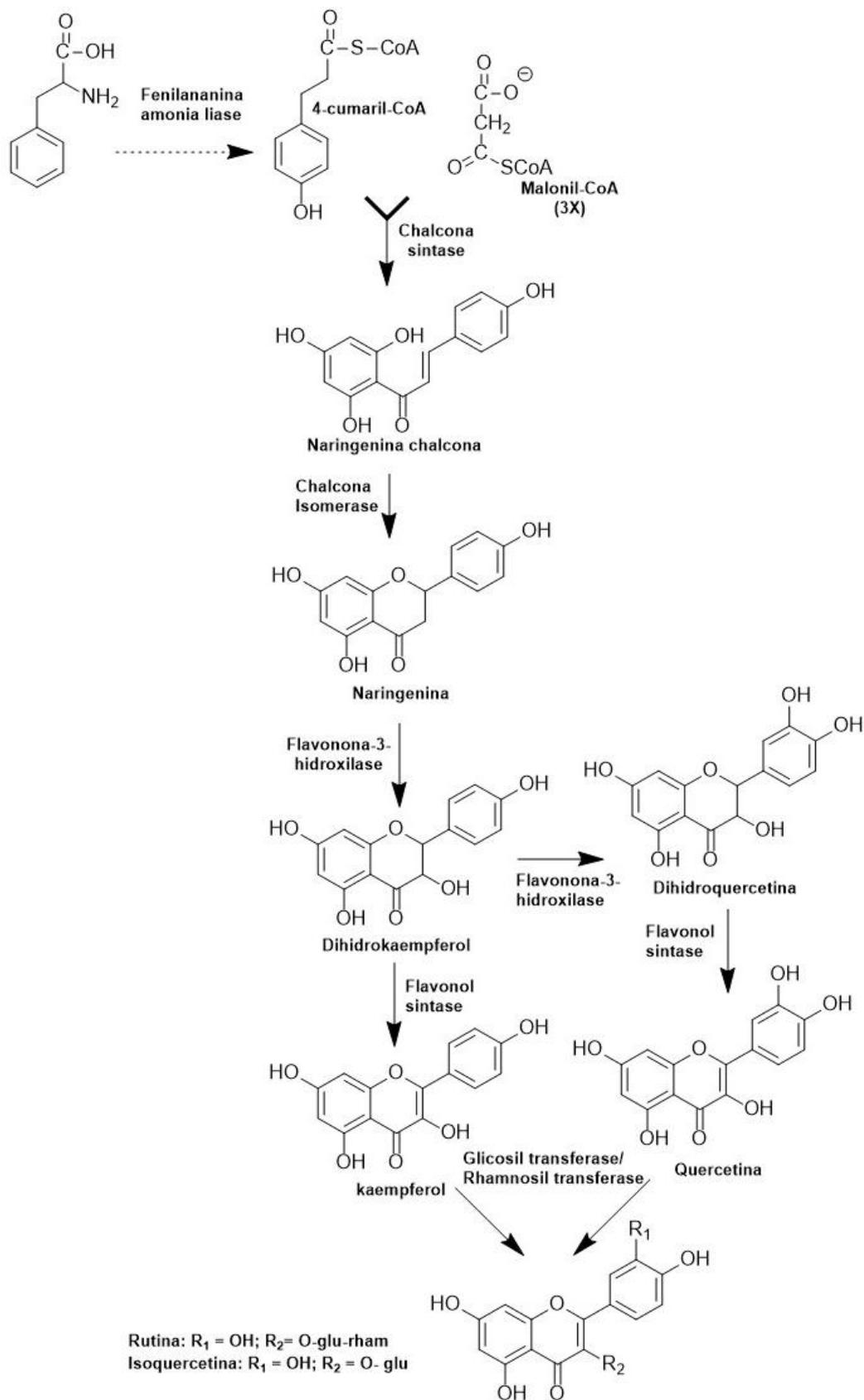


Figura 24. Via biossintética da rutina. Adaptado de MUIR e colaboradores (2001).

2.4.1.1. Atividade anti-inflamatória da rutina

A atividade anti-inflamatória da rutina tem sido amplamente descrita (*in vivo* e *in vitro*), através de mecanismos de acção que promovem a redução da produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigénio e peroxidação lipídica; redução da expressão de NF- κ B e produção de TNF- α , IL-1 e IL-2; redução da ativação de polimorfonucleares e macrófagos (GUARDIA *et al.*, 2001, KAUSS *et al.*, 2008, KYUNG *et al.*, 2008, LEE *et al.*, 2012, NAFEES *et al.*, 2015, UMAR *et al.*, 2012, YEH *et al.*, 2014).

O papel anti-inflamatório e anti-oxidante da rutina tem sido demonstrado na artrite reumatóide (GUARDIA *et al.*, 2001, KAUSS *et al.*, 2008, SANTOS *et al.*, 2014, UMAR *et al.*, 2012), aterosclerose (ISHIZAWA *et al.*, 2011, KAWAI *et al.*, 2008), citotoxicidade induzida por medicamentos (NAFEES *et al.*, 2015, OLIVEIRA *et al.*, 2016, WANI *et al.*, 2011), infeções fúngicas (HAN, 2009, OLIVEIRA *et al.*, 2016), lesão pulmonar aguda (YEH *et al.*, 2014) e obesidade (GAO *et al.*, 2013, HSU *et al.*, 2009).

Um estudo feito por WANI e colaboradores (2011) avaliou o papel profilático do tratamento oral da rutina (75-150 mg/kg) contra a nefrotoxicidade induzida por cisplatina em ratos. A eficácia da rutina foi avaliada com estimativas bioquímicas da atividade de enzimas antioxidantes, de mudanças histopatológicas e da expressão molecular de marcadores de inflamação e apoptose. O grupo pré- tratado com 150mg/kg de rutina apresentou redução significativa dos efeitos renais nocivos induzidos pela cisplatina. O estudo permitiu concluir que os benefícios da rutina são mediados principalmente por sua atividade *scavenger* sobre espécies reativas de oxigénio, uma vez que ROS apresentam papel importante na indução de vias apoptóticas como caspase-3, e na ativação de via inflamatórias como NF- κ B (WANI *et al.*, 2011).

Um estudo feito por Guardia e colegas em modelos de ratos com artrite, avaliou o efeito da administração intraperitoneal de quercetina-3-rutinose e quercetina (80 mg/kg) durante 30 dias. Os resultados mostraram que a quercetina-3-rutinose foi muito eficaz na redução de edema, nódulos e anquilose (rigidez na articulação). Ao fim de 30 dias, a quercetina-3-rutinose reduziu estas características

clínicas em 100%, enquanto a aglicona quercetina reduziu 50%. Esses dados podem sugerir que o açúcar rutinose contribuiu para uma melhor atividade da rutina (GUARDIA *et al.*, 2001).

Um trabalho desenvolvido por YEH e colaboradores (2014) em ratinhos com lesão pulmonar aguda induzida por LPS, avaliou o efeito do tratamento intraperitoneal de rutina (0, 1, 10, ou 100 $\mu\text{mol/kg}$). Para as doses a partir de 10 $\mu\text{mol/kg}$, os resultados demonstram redução no stresse oxidativo e na fosforilação da subunidade p65 do NF-kB, além de redução na degradação do I κ B, com consequente inibição da ativação do fator de transcrição NF-kB, responsável pelo efeito anti-inflamatório (YEH *et al.*, 2014). Noutro estudo desenvolvido por LEE e colaboradores (2012) também se detetou alteração na fosforilação do I κ B após administração de rutina *in vitro*.

Os processos inflamatórios podem induzir grandes aumentos na permeabilidade vascular, levando à ruptura da mesma e contribuindo significativamente para o aumento da morbidade e mortalidade presentes em doenças inflamatórias (LEE *et al.*, 2012). A quercetina-3-rutinose demonstrou reduzir respostas inflamatórias do endotélio vascular induzidas por LPS *in vitro* e *in vivo*. O aumento da integridade da barreira vascular deveu-se à redução da expressão de moléculas de adesão celular, redução da adesão de neutrófilos e da migração transendotelial. Em ratinhos e em células endoteliais da veia umbilical humana, ativados por LPS, estas propriedades protectoras da rutina são mediadas indirectamente através da regulação da expressão de NF-kB e produção de TNF- α e directamente através de alterações da barreira vascular mediada por TNF- α (LEE *et al.*, 2012).

Segundo o estudo publicado por GAO e colaboradores (2013), a rutina (200 μM), reduziu a transcrição de genes que codificam TNF- α , interferão- γ , IL1- β e IL-6, bem como reduziu a produção de ROS, em macrófagos ativados por ácido palmítico. Este mesmo estudo mostra que a rutina (50mg/kg, com aplicação intraperitoneal duas vezes por semana, durante 8 semanas) consegue reduzir o aumento de peso em ratinhos submetidos a dieta rica em gordura (DRG), bem como

bloqueia completamente o aumento do tecido adiposo branco, induzido pela DRG, além de reduzir a hipertrofia de adipócitos e sinais de ativação de macrófagos.

2.4.1.2. Farmacocinética da rutina

Os efeitos benéficos da rutina estão estritamente relacionados com a absorção e distribuição deste composto nos tecidos e células alvo. A biodisponibilidade da quercetina e seus glicosídeos é geralmente baixa e caracterizada por alta variabilidade inter-sujeito, sendo este um crítico mediador da bioatividade destes compostos (GUO *et al.*, 2015).

Segundo estudo desenvolvido por ARTS e colaboradores (2004) não é a posição, mas sim o tipo de açúcar ligado à quercetina que influencia a sua absorção. Um outro estudo feito por OLTROFF e colaboradores (2000) compara a quercetina-3-glicosídeo com a quercetina-4-glicosídeo e mostra que as taxas de absorção não diferem entre elas.

A conjugação com a glicose melhora a absorção da quercetina a partir do intestino delgado (AMARETTI *et al.*, 2015). Outros glico-conjugados de quercetina são pouco absorvidos no trato superior intestinal, chegando ao intestino grosso. A microflora presente no cólon hidroliza a maior parte da rutina ou outros glico-conjugados, removendo o açúcar e possibilitando a absorção da aglicona (AMARETTI *et al.*, 2015).

Um estudo feito por JAGANATH e colaboradores (2006) investigou a diferença de absorção de 300 mL de suco de tomate enriquecido com rutina (176 µM) em 6 voluntários saudáveis e 5 voluntários com ileostomia. Nos voluntários saudáveis foram detectados principalmente dois metabolitos no plasma: quercetina-3-O-glicuronídeo e isorhamnetina-3-O-glicuronídeo; e três metabolitos na urina: 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético e ácido 3-hidroxifenilacético (Figura 25). A excreção da rutina intacta na urina variou de 0,02% a 2,8%, possivelmente devido a diferenças na flora intestinal. Os voluntários com ileostomia

não apresentaram nenhum metabolito na urina ou no plasma, no entanto, foi detectado no fluído ileal 86% da rutina ingerida (JAGANATH *et al.*, 2006).

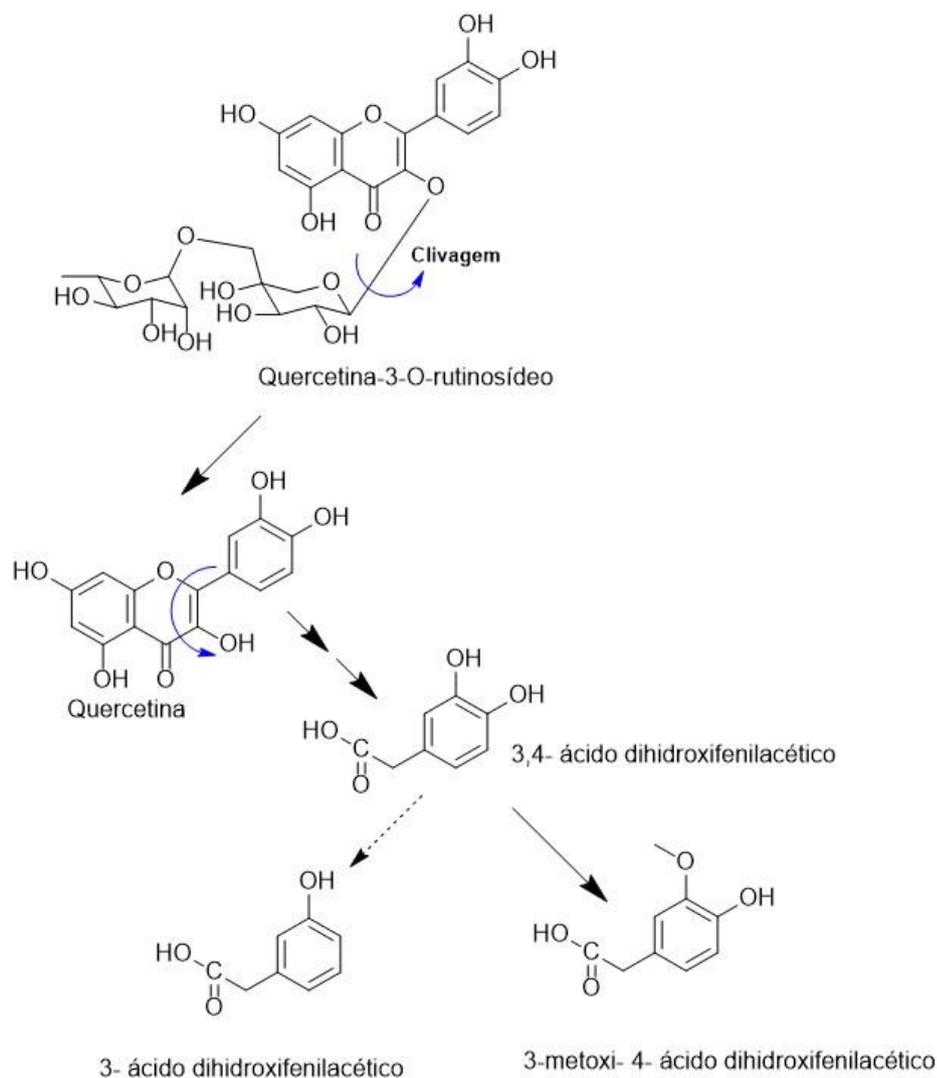


Figura 25. Via proposta para o catabolismo da quercetina-3-O-rutinosídeo no intestino grosso, mediado por bactérias do cólon. A seta pontilhada indica uma via de menor importância. Fonte: CROZIER *et al.* (2010).

Um estudo feito por KAMMALLA e colaboradores (2015) compara a absorção da rutina (2.5mg/Kg) co-administrada com a quercetina ou com um medicamento fitoterápico contendo *Hippophae rhamnoides* em ratos. Observa-se que a biodisponibilidade da rutina aumenta quando administrada com o fitoterápico em comparação com a quercetina. A sua concentração máxima no plasma passa de $61,1 \pm 29,3$ ng/mL para $121,7 \pm 19,2$ ng/mL. Possivelmente, a interação de outros constituintes do fitoterápico com as enzimas hidrolíticas aumentaram a biodisponibilidade da rutina.

Para superar os problemas de biodisponibilidade oral da rutina, várias técnicas têm sido estudadas, como a complexação com ciclodextrina e fitossomos/fosfolípidos, bem como sistemas de nanopartículas. Espera-se que em num futuro próximo novas tecnologias de 'drug delivery' com efeitos colaterais mínimos aumentem a biodisponibilidade da rutina e consequentemente melhorem a sua acção a nível fisiológico (MAULUDIN *et al.*, 2009a, b, SHARMA *et al.*, 2013, SINGH *et al.*, 2012).

2.4.2. Naringina

O nome naringina provavelmente deriva do termo em sânscrito 'narangi' que significa laranja. Está presente em frutas cítricas, uvas, feijão, cerejas, cacau, orégão e tomate. A naringina é uma flavonona glicosilada, composta da aglicona naringenina e do glicosídeo neohesperidoside (Figura 26) (BHARTI *et al.*, 2014).

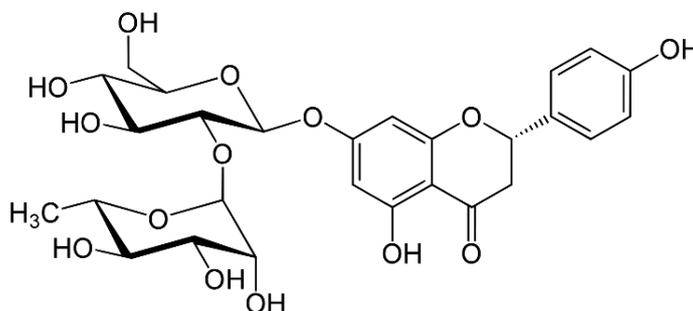


Figura 26. Estrutura química da naringina

A naringina e a hesperidina são as principais flavononas glicosídicas de ocorrência natural em frutos cítricos (KANAZE *et al.*, 2007). A naringina é relativamente solúvel em água (1mg/mL a 40° C) e está presente em sucos de toranja em concentrações superiores a 800mg/L, ocorrendo como uma mistura de isómeros quirais que varia em função da fruta e do método de purificação (WILCOX *et al.*, 1999).

Durante as últimas décadas, a interação entre fármacos e sucos de frutas despertou interesse em pesquisas e na prática clínica (NGUYEN *et al.*, 2015). O suco de toranja é muito conhecido por alterar a farmacocinética de vários fármacos, aumentando ou diminuindo sua biodisponibilidade (BAILEY *et al.*, 1993, BAILEY *et al.*, 1998, FUHR *et al.*, 1995). Os compostos presentes no suco de toranja, reconhecidamente, inibem a CYP3A4 e a OATP1A2 (do inglês, *Organic Anion-Transporting Polypeptide*). A enzima CYP3A4 é uma das principais responsáveis pelo metabolismo de fármacos, enquanto as OATPs são responsáveis pela captação de vários fármacos para o interior de enterócitos e hepatócitos (REBELLO *et al.*, 2012).

Um estudo feito por BAILEY *et al.* (2007) mostra que a naringina é o principal agente inibidor de OATPs em sucos de toranja. *In vitro*, a naringina apresenta um IC₅₀ de 3,6µM para a OATP1A2, 410µM para a OATP2B1, 3000µM para a P-glicoproteína e 41000µM para CYP3A4 (BAILEY *et al.*, 2007). Deste modo, a inibição da AOTP1A2 é o efeito da naringina mais expressivo na interação com outros fármacos.

A nariginina e sua aglicona narigenina apresentam forte atividade anti-inflamatória e anti-oxidante. Muitas linhas de investigação sugerem que a suplementação deste flavonóide é benéfica para o tratamento da obesidade, diabetes, hipertensão e síndrome metabólica (ALAM *et al.*, 2014).

2.4.2.1. Atividade anti-inflamatória da naringina

A atividade anti-inflamatória da naringina tem sido descrita na literatura para asma (GUIHUA *et al.*, 2016, JIAO *et al.*, 2015), inflamação pulmonar aguda (AHMAD *et al.*, 2015, LUO *et al.*, 2012), lesão óssea (CAO *et al.*, 2015), citotoxicidade induzida por medicamentos (CHTOUROU *et al.*, 2016, KANNO *et al.*, 2004, ZHAO *et al.*, 2015), síndrome metabólica (ALAM *et al.*, 2014), artrite (CHTOUROU *et al.*, 2015), obesidade e problemas cardiovasculares (ALAM *et al.*, 2013).

Os mecanismos descritos para a atividade anti-inflamatória da naringina consistem na inibição da via do NF-κB; redução da produção de NO, TNF-α e IL-6;

redução da expressão de COX-2 e iNOS (AHMAD *et al.*, 2015, BI *et al.*, 2016, KANNO *et al.*, 2006, REN *et al.*, 2015, SAHU *et al.*, 2014, ZHAO *et al.*, 2015), bem como atividade anti-apoptótica (CHTOUROU *et al.*, 2016, CHTOUROU *et al.*, 2015, MANNA *et al.*, 2015).

Ratinhos pré-tratados com naringina intraperitoneal apresentam uma redução, dependente da dose, da mortalidade associada ao choque por endotoxina, induzido por LPS. Para doses de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 60 mg/kg a redução da mortalidade ao fim de 48 h foi de 10%, 50% e 70%, respectivamente. No entanto, a naringina não mostra eficácia quando administrada após a administração de LPS, apresentando apenas efeito preventivo (KANNO *et al.*, 2006). Verifica-se ainda uma redução, dependente da dose, dos níveis séricos de TNF- α e NO nos ratinhos. Um estudo *in vitro*, realizado em macrófagos RAW 264.7, mostrou que a naringina reduz a expressão de genes inflamatórios como a iNOS, TNF- α , COX-2 e IL-6, bem como a atividade transcricional do NF-kB (KANNO *et al.*, 2006).

Um estudo desenvolvido por SAHU *et al.* (2014) analisa o efeito da naringina (100 mg/Kg, oral por 7 dias) na nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratinhos. O co-tratamento da naringina com a gentamicina, em comparação com o tratamento apenas com a gentamicina, reduz os níveis séricos de ureia e de creatinina, e produz uma histo-arquitetura aparentemente normal, com degeneração tubular média sem infiltrado inflamatório; reduz o stresse oxidativo renal; e melhora a função mitocondrial. Observa-se também que a ativação e translocação do NF-kB em resposta ao stresse oxidativo são significativamente reduzidas, bem como os níveis das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 (SAHU *et al.*, 2014).

A naringina tem mostrado efeito farmacológico, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, na via de sinalização intracelular do NF-kB. Segundo o estudo feito por AHMAD *et al.* (2015), a naringina reduz a ativação da subunidade p65 do NF-kB, bem como previne a degradação do I κ B α .

2.4.2.2. Farmacocinética da naringina

Tal como verificado para outros flavonoides, a absorção oral de naringina é reduzida, sendo este composto amplamente metabolizado antes e após a absorção (LI *et al.*, 2013a). O processo de absorção e metabolização da naringina é semelhante ao que ocorre com a rutina (KANAZE *et al.*, 2007).

Um estudo desenvolvido por FELGINES *et al.* (2000) compara a biodisponibilidade oral da naringenina, naringina e hesperidina em 3 grupos de ratinhos, tendo a naringina apresentado a menor biodisponibilidade. Foram feitas dosagens séricas da presença da aglicona naringenina 3, 10 e 24 horas após a ingestão das flavononas. Observou-se que 3 horas após a ingestão, apenas o grupo da naringina não apresentou naringenina sérica. No entanto, 10 horas após a ingestão, os valores séricos de naringenina aumentaram e apresentaram-se similares para as três flavononas. O atraso na absorção da naringina pode estar relacionado com o fato da sua absorção não ocorrer no trato digestivo superior, bem como pela possível exigência da hidrólise do seu glicosídeo (FELGINES *et al.*, 2000).

Num outro estudo desenvolvido por ZHANG *et al.* (2012), um grupo de ratinhos foi sujeito a uma administração oral de naringina numa dose de 746,7 mg/kg. A naringina atingiu a concentração plasmática máxima de 2300 ng/mL em 45 minutos; essa concentração foi reduzida após 2 horas da ingestão, sendo que a naringina não foi detectada após 24 horas da ingestão.

2.5. Estilbenos glicosilados

Os estilbenos são caracterizados estruturalmente pela presença de núcleos 1,2-difeniletileno e podem ser do tipo monomérico ou oligomérico (SHEN *et al.*, 2009). Na natureza aparecem maioritariamente sob a forma *trans* (isômero E). Tem-se observado que os isômeros Z e E apresentam propriedades farmacológicas diferentes (ROBERTI *et al.*, 2003, ROUPE *et al.*, 2006, WAFFO-TÉGUO *et al.*, 2001) (Figura 27).

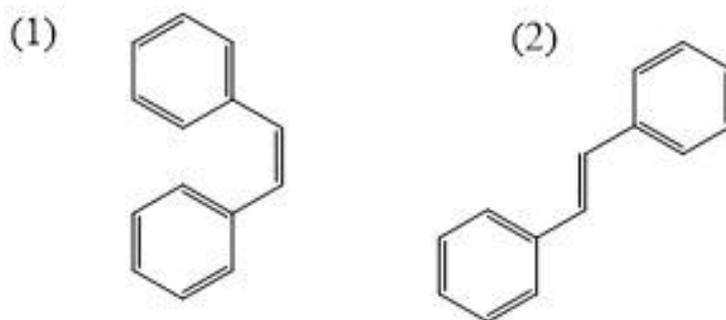


Figura 27. Estrutura básica dos estilbenos e suas formas (1) *cis* e (2) *trans*.

A maioria dos estilbenos derivam de unidades básicas de *trans*-resveratrol e outras estruturas são encontradas em famílias específicas. Exemplos de plantas que contêm estilbenos incluem uva (*Vitaceae*), pinheiro (*Pinaceae*), amendoim (*Fabaceae*) e sorgo (*Poaceae*) (CHONG *et al.*, 2009).

Os estilbenos estão presentes num número limitado de plantas, sendo que a sua expressão depende da presença da enzima estilbeno sintase. Todas as plantas superiores sintetizam malonil-CoA e ésteres de CoA derivados do ácido cinâmico, mas apenas algumas famílias botânicas, muitas vezes filogeneticamente distantes como *Gnetaceae*, *Pinaceae*, *Dipterocarpaceae* e *Vitaceae*, sintetizam estilbenos (CHONG *et al.*, 2009, RIVIÈRE *et al.*, 2012).

A primeira etapa na biossíntese dos estilbenos, comum a biossíntese dos flavonóides, compreende a formação de um policetídeo a partir de três malonil-CoA e um éster de CoA derivado do ácido cinâmico. O policetídeo resultante pode ser substrato da chalcona sintase ou estilbeno sintase, originando flavonóides ou estilbenos, respetivamente (RIVIÈRE *et al.*, 2012) (Figura 28).

A glicosilação de estilbenos contribui para o armazenamento, a translocação, a modulação da atividade antifúngica e a protecção contra a degradação oxidativa desses compostos (FLAMINI *et al.*, 2013). A glicosilação inibe a oxidação enzimática do resveratrol, tanto nas plantas quanto no trato digestivo humano, preservando a sua atividade biológica e aumentando sua estabilidade e biodisponibilidade (BRISDELLI *et al.*, 2009).

como elementos de resistência a nematóides em pinheiros, barreira contra herbívoros em amieiro verde, proteção contra insetos em *Yucca periculosa*, bem como compostos antifúngicos na prevenção da deterioração da madeira. Estilbenos constitutivos podem atuar também como aleloquímicos, inibindo o crescimento ou a fotossíntese de plantas vizinhas (JEANDET *et al.*, 2010).

Apesar da baixa ocorrência em plantas, nos últimos anos os estilbenos têm despertado interesse devido a suas funções fisiológicas benéficas em humanos. A alta ingestão de gordura, estilo de vida sedentário e consumo de vinho diário, faziam parte dos costumes da população do norte da França, cuja incidência de doenças cardiovasculares era paradoxalmente reduzida. Tal fato, conhecido como “paradoxo francês”, atribuiu ao consumo de vinho tinto o papel de protetor cardiovascular e evidenciou, a partir da década de 90, o potencial efeito terapêutico do resveratrol e seus derivados (ARTERO *et al.*, 2015, GAMBINI *et al.*, 2015, LIPPI *et al.*, 2010, RENAUD *et al.*, 1992).

Uma atenção especial foi dada ao resveratrol, quando SIEMANN *et al.* (1992) relatou a presença de *trans*-resveratrol no vinho tinto. O resveratrol é um ingrediente ativo da medicina tradicional chinesa com efeito terapêutico em doenças cardiovasculares (BRADAMANTE *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que o resveratrol é responsável pelos benefícios cardiovasculares associados ao consumo moderado de vinho (ARTERO *et al.*, 2015, BRADAMANTE *et al.*, 2004, LIPPI *et al.*, 2010).

Além do conhecido efeito sobre o sistema cardiovascular, os estilbenos têm sido descritos na literatura como antioxidantes (HE *et al.*, 2013, RYU *et al.*, 2002), anti-tumorais (AGGARWAL *et al.*, 2004, BRISDELLI *et al.*, 2009, SIREROL *et al.*, 2015, WAFFO-TÉGUO *et al.*, 2001), anti-inflamatórios (CALABRISO *et al.*, 2015, FUGGETTA *et al.*, 2011), e agentes terapêuticos contra doenças relacionada com o envelhecimento (KASITIS *et al.*, 2013, REINISALO *et al.*, 2015).

2.5.1. Polidatina

A polidatina (PD), também chamada de E-piceide, é um polifenol glicosilado do tipo estilbeno, sua aglicona é o resveratrol e seu glicosídeo é a glicose (Figura 29) (DU *et al.*, 2013). A polidatina é a forma mais abundante de resveratrol na natureza. É encontrada em vinho tinto, lúpulo, amendoim, produtos de chocolate e produtos contendo cacau (WU *et al.*, 2015b).

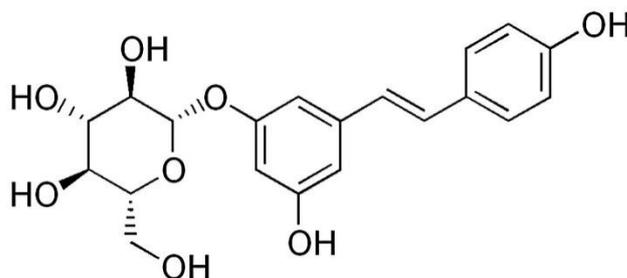


Figura 29. Estrutura química da polidatina.

O piceide é um monocrystal, isolado pela primeira vez em 1963, a partir de raízes e risomas de *Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc*, uma planta da medicina tradicional chinesa, usada no tratamento da inflamação, infecção, icterícia, queimaduras da pele e hiperlipidemia (PENG *et al.*, 2013). Esta planta é rica em resveratrol e polidatina. O teor médio de polidatina é de cerca de 3-8 mg/g, sendo considerada a fonte concentrada mais importante deste estilbeno (PENG *et al.*, 2013).

O E- piceide tem uma glicose ligada na posição C-3 do resveratrol, substituindo um grupo hidroxilo. Esta substituição gera uma alteração conformacional na molécula, alterando suas propriedades biológicas. O piceide é mais resistente à oxidação enzimática do que o resveratrol, além de mais hidrossolúvel (REGEV-SHOSHANI *et al.*, 2003).

A polidatina tem sido relatada na literatura como anti-agregante plaquetário (WANG *et al.*, 2004), anti-oxidante (CHEN *et al.*, 2015, FABRIS *et al.*, 2008), agente cardioprotetor (LIU *et al.*, 2012), anti-inflamatório (CALABRISO *et al.*, 2015, LANZILLI *et al.*, 2012, RAVAGNAN *et al.*, 2013), regulador da função imune (FUGGETTA *et al.*,

2011), regulador de choque severo (LI *et al.*, 2015, WANG *et al.*, 2013) e ainda na síndrome de disfunção múltipla de órgãos (ZENG *et al.*, 2015).

2.5.1.1. Atividade anti-inflamatória da polidatina

A atividade anti-inflamatória da polidatina tem sido relatada em doenças neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2015, JI *et al.*, 2012), doenças ateroscleróticas (CALABRISO *et al.*, 2015, WU *et al.*, 2015a), lesão pulmonar (JIANG *et al.*, 2015, LI *et al.*, 2013b, SHIYU *et al.*, 2011), lesão renal (CHEN *et al.*, 2013, LIU *et al.*, 2015, XIE *et al.*, 2012) e colite ulcerosa (YAO *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, a polidatina exerce os seus efeitos anti-inflamatórios através da inibição da via do NF- κ B, redução da expressão de COX-2 e iNOS, redução da produção de óxido nítrico, TNF- α , PGE-2, IL-1 (CHEN *et al.*, 2013, HE *et al.*, 2012, JIANG *et al.*, 2015, LI *et al.*, 2013b, XIE *et al.*, 2012), atividade anti-oxidante (CHEN *et al.*, 2015, FABRIS *et al.*, 2008, WANG *et al.*, 2015) e supressão da atividade da fosfolipase A2 (SHIYU *et al.*, 2011).

Idealmente, os radicais gerados durante o metabolismo deveriam ser neutralizados por um elaborado sistema anti-oxidante endógeno. No entanto, fatores ambientais, como o estilo de vida e diversas patologias, geram um excesso de radicais que pode resultar em stresse oxidativo. O stresse oxidativo tem sido relacionado com problemas cardiovasculares, cancro, inflamação e outras doenças crónicas (WILLCOX *et al.*, 2004).

Segundo WANG e colaboradores (2015), a polidatina tem maior acção contra radicais livres do que o resveratrol, aumentando mais expressivamente a quantidade de glutathiona, considerado um marcador hidrossolúvel da capacidade anti-oxidante, e aumentando a atividade da catalase e da superóxido dismutase, após administração oral em ratinhos. Este estudo mostra ainda que ocorre uma interconversão *in vivo* entre a polidatina e o resveratrol, sendo que o composto glicosilado apresenta maior nível sérico após a administração de ambos (WANG *et al.*, 2015). Uma outra pesquisa mostra que a captação de radicais por parte da polidatina

é maior que a do resveratrol, pois este último pode reagir com uma molécula do próprio radical, reduzindo dessa forma o seu potencial anti-oxidante (FABRIS *et al.*, 2008).

CHEN e colaboradores (2013) avaliaram o efeito do tratamento oral da polidatina sobre um modelo de ratinhos de nefropatia úrica. Este trabalho comparou o efeito da polidatina com o alopurinol, e mostra que o estilbeno ($IC_{50} = 65,2 \mu M$, *in vitro*) inibe a xantina oxidase, assim como o alopurinol ($IC_{50} = 8,1 \mu M$, *in vitro*), reduzindo a produção de ácido úrico. No entanto, em contraste com o alopurinol, a PD não apresentou efeitos adversos sobre o fígado, rins e sistema imune neste estudo. Apesar da PD apresentar menor redução dos níveis de ácido úrico, ela mostrou um efeito anti-oxidante superior ao alopurinol e inibiu as respostas inflamatórias por regulação negativa da cascata induzida por NF-kB (CHEN *et al.*, 2013) (Figura 30).

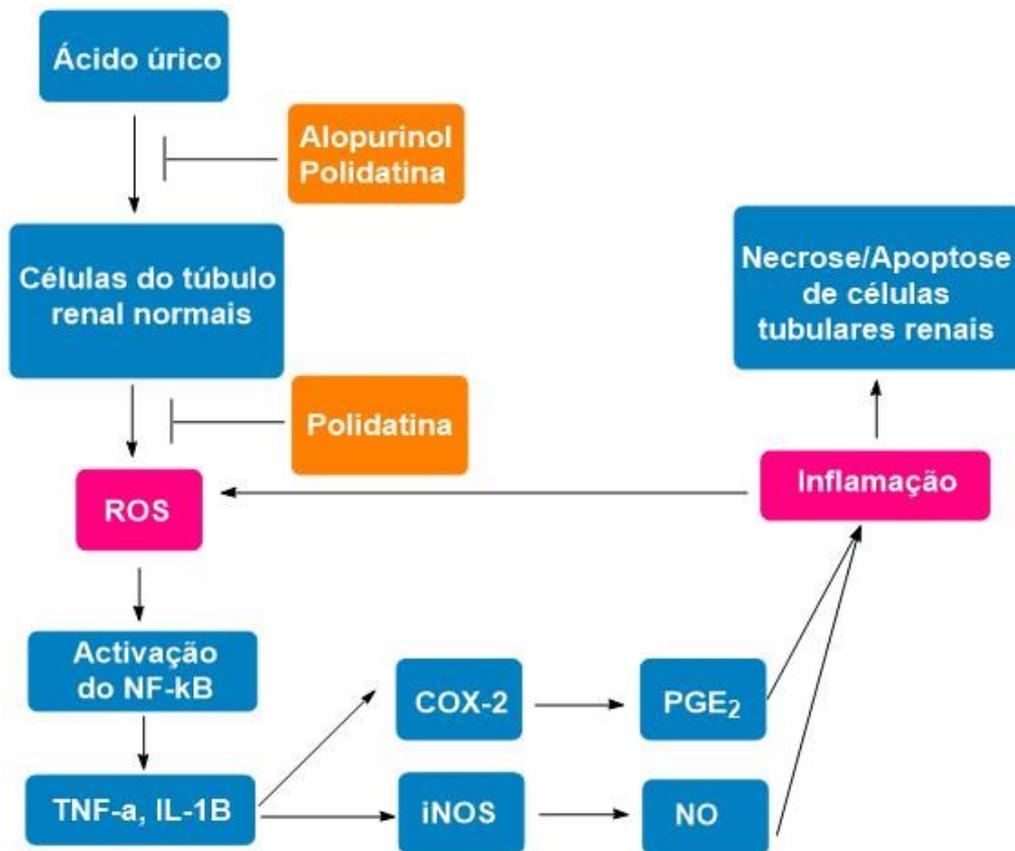


Figura 30. Mecanismo de ação proposto para a polidatina em nefropatia úrica induzida em ratinhos. Adaptado de CHEN *et al.* (2013).

A formação de ROS é induzida em tecidos cerebrais em situação de isquemia. Esse excesso de ROS pode ativar diversas vias de sinalização e induzir stresse oxidativo e respostas inflamatórias (JI *et al.*, 2012). A administração intraperitoneal de polidatina (50mg/kg) a ratinhos com acidente vascular encefálico isquêmico tem efeito neuroprotetor, através da redução de danos oxidativos e inflamatórios e redução da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE). Estes efeitos são obtidas através da regulação positiva, por parte da polidatina, da expressão de Gli1, Ptch1 e SOD1, que contrariam o stresse oxidativo, e ainda da *claudin-5*, proteína que tem um papel fundamental na regulação da permeabilidade da BHE, além da regulação negativa da via do NF- κ B (JI *et al.*, 2012).

A exposição de células ao LPS induz, a partir da ligação do mesmo à glicoproteína MD2, a translocação de recetores de TLR4 do complexo de Golgi para a membrana plasmática (SENDER *et al.*, 2014). A polidatina inativa, significativamente, a translocação de TLR4, MyD88 e IRAK-1 para membranas de células expostas ao LPS. Como resultado, o pré-tratamento com a polidatina bloqueia eficazmente a fosforilação de IKK- α , IKK- β , I κ B- α e NF- κ B e, conseqüentemente, atenua os efeitos da lesão pulmonar aguda em ratinhos, induzida por LPS (JIANG *et al.*, 2015).

2.5.1.2. Farmacocinética da polidatina

Ao contrário do resveratrol que é absorvido de forma passiva, a polidatina, devido à sua ligação a glicose, é absorvida no intestino delgado através do transportador ativo sódio-dependente (SGTL1). No entanto, o *trans*-piceide pode sofrer hidrólise da ligação glicosídica no interior dos enterócitos, por acção da β -glicosidase (HENRY *et al.*, 2005).

Após a administração oral, 98.4% da polidatina é metabolizada no intestino e no fígado. O resveratrol glucuronado é o principal metabolito deste composto, podendo alcançar 84% do total (DU *et al.*, 2013). Estudos *in vivo* têm mostrado que o *trans*-piceide, *trans*-resveratrol, *trans*-3-O- β -glucoronídeo e o *trans*-piceide sulfatado

são detectados no plasma após a administração oral de *trans*-piceide, tanto em humanos quanto em ratinhos (BURKON *et al.*, 2008, ZHOU *et al.*, 2007).

2.6. Modulação da atividade biológica de compostos polifenólicos através de modificações estruturais

Apesar do extenso uso dos flavonóides na área farmacêutica, cosmética e de preparação de alimentos, estes compostos têm limitada estabilidade e solubilidade tanto em fases lipídicas quanto aquosas (ARDHAOUI *et al.*, 2004, CHEBIL *et al.*, 2006, VISKUPIČOVÁ *et al.*, 2009). Com o objetivo de melhorar essas propriedades, muitos autores têm proposto modificações nas suas estruturas através de reações químicas, enzimáticas ou quimio-enzimáticas. As reações de glicosilação e de acilação têm recebido especial destaque. A glicosilação é responsável pelo aumento do caráter hidrofílico, ao passo que a acilação torna os polifenóis mais hidrofóbicos (ARDHAOUI *et al.*, 2004, CHEBIL *et al.*, 2006).

Devido à presença relativamente abundante, bem como à alta reatividade dos grupos hidroxilos, as reações de acilação de polifenóis estão associadas a problemas de regioseletividade o que leva a perda de grupos responsáveis pelas atividades anti-oxidantes dos flavonóides (CHEBIL *et al.*, 2006). Visando contornar a problemática da seletividade dessas reações, tem-se usado, com muita frequência, a catálise enzimática. Existem várias patentes que descrevem a produção de ésteres de flavonóides e sua utilização para o fabrico de produtos farmacêuticos, dermofarmacêuticos, cosméticos, composições nutracêuticas ou agro-alimentares (VISKUPIČOVÁ *et al.*, 2009).

A acilação seletiva dessas moléculas poli-hidroxiladas pode alterar as suas propriedades biológicas e farmacológicas, produzindo análogos aptos para estudos de relação estrutura atividade, em particular relativamente à habilidade de penetrar as membranas celulares (KATSOURA *et al.*, 2006).

Um estudo desenvolvido por SALEM *et al.* (2011), demonstrou, por meio de testes *in vitro*, que derivados ésteres da isoramnetina-3-O-glucosídeo apresentam

maior atividade relativamente à xantina oxidase do que a isoramnetina-3-O-glucosídeo. A isoramnetina-3-O-glucosídeo apresentou um IC_{50} de 174 μM , seu derivado butiril éster (C4:0) mostrou um IC_{50} de 61 μM , e o derivado lauril éster (C12:0) mostrou um IC_{50} de 13 μM . Este resultado indica ocorrer uma relação direta entre o tamanho da cadeia acil e a atividade para a xantina oxidase. Este estudo indica ainda que os derivados ésteres apresentam maior inibição no crescimento de células tumorais Caco2, onde a isoramnetina-3-O-glucosídeo mostra um IC_{50} de 162 μM , o derivado butiril éster um IC_{50} de 100 μM e o derivado lauril éster um IC_{50} de 81 μM (SALEM *et al.*, 2011).

MELLOU e colaboradores (2005), avaliaram a atividade de dois flavonóides extraídos de plantas endêmicas gregas, o monossacarídeo crisoeril-7-O- β -D-(3''-E-p-cumaroílo) glucopiranósido e o dissacarídeo crisoeril-7- [6''-O-acetil- β -D-alosilo-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranósido] e dois ésteres de laurato de vinilo derivados destes flavonóides, obtidos por catálise enzimática a partir da lipase de *Candida antarctica* (Figura 31).

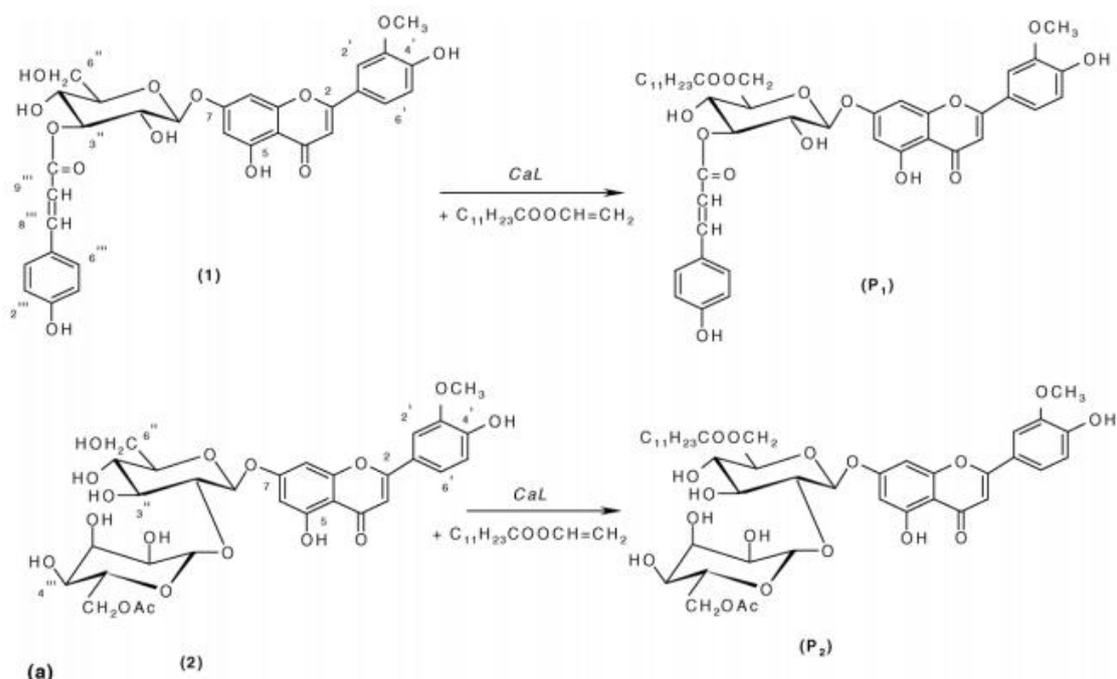


Figura 31. Esterificação enzimática de crisoeril-7-O- β -D-(3''-E-p-cumaroílo) glucopiranósido, e crisoeril-7- [6''-O-acetil- β -D-alosilo-(1 \rightarrow 2) - β -D-glucopiranósido].

Observou-se que o composto chamado de P₂ (figura 30) foi o único, entre os quatro, a apresentar atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas *S. aureus* (MIC 1000 µg/mL) e *B. Cereus* (MIC 500 µg/mL), sendo que o MIC da estreptomicina para ambas as bactérias é de 1000 µg/mL (MELLOU *et al.*, 2005). A acilação também melhorou a atividade antioxidante dos dois flavonóides relativamente à LDL, onde o derivado P1 apresenta-se cerca de 2 vezes mais potente que o flavonóide 1 e o derivado P2 apresenta-se cerca de 20 vezes mais potente que o flavonóide 2. Possivelmente, o aumento da lipofilicidade afectou a incorporação dos compostos na parte lipídica da partícula de LDL, facilitando o acesso ao local da peroxidação lipídica (MELLOU *et al.*, 2005).

Um estudo recente (SUDAN *et al.*, 2015) testou a atividade de derivados ésteres de cadeia longa de isoquercetina (ésteres de ácido oleico, esteárico, linolénico, linoleico, eicosapentaenóico, docosahexaenóico), em linhas celulares humanas de carcinoma hepático (HepG2). Observou-se que os derivados ésteres apresentam ação antiproliferativa e menor citotoxicidade em células normais relativamente à quercetina, sorafenib e cisplatina nas mesmas concentrações.

Uma série de 3-O-acetil(-) -epigallocatequina foi sintetizada e as suas capacidades inibitórias foram testadas relativamente à 5 α -reductase. A inibição da 5 α -reductase aumenta com o aumento do número de átomos de carbono do ácido gordo saturado ligado à epigallocatequina. O composto de maior atividade, um éster do ácido palmítico (16 carbonos), apresentou um IC₅₀ 0,53µM, e mostrou-se cerca de 12 vezes mais potente que a epigallocatequina (IC₅₀ 6.29µM). A substituição do ácido gordo saturado por um ácido gordo insaturado aumentou levemente a atividade, gerando o composto mais potente com um IC₅₀ de 0,48µM, que mostrou moderada atividade antitumoral *in vivo*: o tamanho do tumor no 28º dia de tratamento foi de 38% para o derivado éster (20mg/Kg) e de 32% para a epigallocatequina (80 mg/kg) (LIN *et al.*, 2010).

Muitos polifenóis acabam por não originar medicamentos devido à pobre biodisponibilidade oral e à inadequação às regras dos 5 de Lipinsky. No entanto, estratégias de síntese podem elaborar análogos mais atrativos, como

frequentemente acontece com moléculas derivadas de produtos naturais. Além disso, novos compostos semi-sintéticos são importantes para estudos de relação estrutura-atividade, objetivando o entendimento dos mecanismos de ação dos compostos analisados (QUIDEAU *et al.*, 2011).

Diante dos fatos supracitados é evidente que as modificações estruturais de compostos fenólicos são promissoras, tanto no que diz respeito à alteração das características farmacodinâmicas como das características farmacocinéticas.

3. Biocatálise

Muito antes da humanidade saber da existência dos microrganismos, já os utilizava em processos fermentativos. A produção de bebidas alcólicas a partir de grãos por sumérios e babilônios, data de 6000 a.C.. No entanto, só em 1856, Louis Pasteur consegue provar que as fermentações eram feitas por microrganismos, e que cada microrganismo produzia um processo específico de fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

No fim do século XIX, Eduard Buchner muda a perspectiva do uso de enzimas, quando relata uma fermentação bem-sucedida de açúcar por extratos de levedura *cell-free*, mostrando que as transformações biológicas não requeriam necessariamente células vivas (REETZ, 2013).

Em meados do século XX, indústrias farmacêuticas como Upjohn, Schering, Pfizer, e Merck, demonstraram pela primeira vez a hidroxilação oxidativa regio- e estereosseletiva de esteróides catalisada por cepas microbianas (REETZ, 2013). Na mesma época, técnicas para isolamento e purificação de enzimas foram otimizadas, e o ritmo de desenvolvimento da biocatálise em química orgânica sintética aumentou gradualmente nos anos 1960, 1970, e 1980, em paralelo aos avanços na descoberta de mecanismos enzimáticos (REETZ, 2013).

O termo biocatálise denota o uso de enzimas (biocatalisadores) para desenvolver transformações químicas (TORRELO *et al.*, 2015). A maior vantagem do uso de enzimas é a seletividade, nomeadamente a enantiosseletividade, que

rotineiramente alcança >99% (BOMMARIUS *et al.*, 2004). Além do fato da biocatálise propiciar a síntese de moléculas complexas que dificilmente conseguiriam ser produzidas através da síntese orgânica clássica (KOELLER *et al.*, 2001).

Como desvantagens do uso de enzimas como catalisadores, aparecem a instabilidade em pH e temperaturas extremas, disponibilidade apenas para reações específicas e longo tempo de desenvolvimento de novos biocatalisadores (BOMMARIUS *et al.*, 2004).

Entretanto, o fato dos biocatalisadores atuarem sob condições amenas, como pH fisiológico e temperatura ambiente, pode ser um ponto positivo se forem consideradas as questões ambientais (BOMMARIUS *et al.*, 2004). Essas características fazem como que a biocatálise siga alguns dos 12 princípios da química verde (Tabela 8), sendo assim caracterizada, por muitos, como um tipo de reação 'verde'.

As reações biocatalisadas representam uma extensão das rotas clássicas de síntese com significantes reduções nos impactos ambientais gerados pelos processos clássicos. A biocatálise também é um dos processos que podem ser explorados no desenvolvimento da química verde. A alta região e estereo seletividade das bioconversões pode simplificar os processos industriais, aumentando o rendimento e diminuindo a geração de subprodutos (PRADO, 2003).

A fim de aplicar as características da química verde presentes na biocatálise, é essencial integrar transformações enzimáticas estrategicamente em transformações químicas, com o objetivo de desenvolver processos biocatalíticos capazes de substituir rotas químicas menos eficazes e com custo de produção mais elevados (TAO *et al.*, 2009). Esses métodos tem sido buscados pela indústria farmacêutica, com o intuito de contornar a síntese dificultada de produtos com alta região e estereoseletividade, que frequentemente exigem múltiplas etapas de proteção e desproteção (POLLARD *et al.*, 2007).

Tabela 8. 12 princípios da química verde. Fonte: PRADO (2003.)

12 princípios da química Verde	
1. Prevenção	É melhor prevenir a formação de subprodutos do que tratá-los posteriormente
2. Economia atômica	Os métodos sintéticos devem ser desenvolvidos para maximizar a incorporação dos átomos dos reagentes nos produtos finais desejados.
3. Sínteses com compostos de menor toxicidade	Sempre que possível deve-se substituir compostos de alta toxicidade por compostos de menor toxicidade nas reações químicas
4. Desenvolvimento de compostos seguros	Os produtos deverão ser desenvolvidos para possuírem a função desejada, apresentando a menor toxicidade possível.
5. Diminuição de solventes e auxiliares	A utilização de solventes, agentes de separação, e outros deverão ser evitados quando possível.
6. Eficiência energética	Os métodos sintéticos deverão ser conduzidos sempre que possível à pressão e temperatura ambientes, para diminuir a energia gasta durante um processo químico.
7. Uso de substâncias recicladas	Os produtos e subprodutos de processos químicos deverão ser reutilizados sempre que possível.
8. Redução de derivativos	O uso de reagentes bloqueadores, de proteção ou desproteção, modificadores temporários deverão ser minimizados ou evitados quando possível, pois estes passos reacionais requerem reagentes adicionais e podem produzir subprodutos indesejáveis.
9. Catálise	A aplicação de catalisadores para aumentar a velocidade e o rendimento dos processos químicos.
10. Desenvolvimento de compostos para degradação	Produtos químicos deverão ser desenvolvidos para a degradação inócua de produtos tóxicos, para não persistirem no ambiente.
11. Análise em tempo real para a prevenção da poluição	As metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para controlar a formação de compostos tóxicos.
12. Química segura para a prevenção de acidentes	As substâncias usadas nos processos químicos deverão ser escolhidas para minimizar acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios.

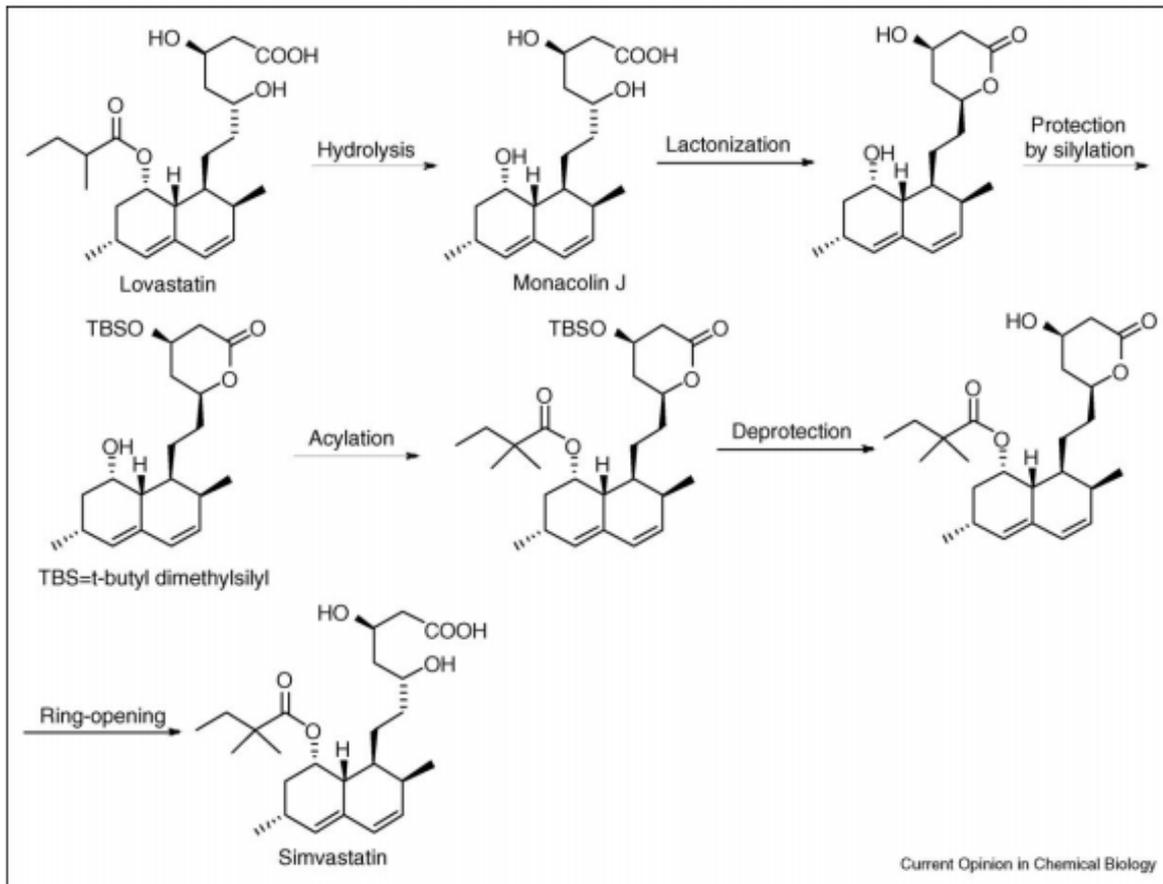


Figura 32. Síntese química da simvastatina a partir da lovastatina via monocolina J.

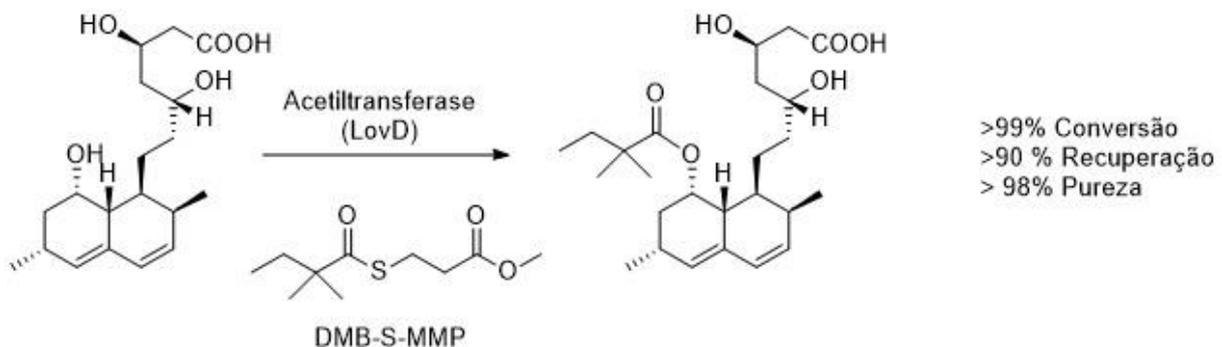


Figura 33. Síntese enzimática da simvastatina a partir da monocolina J por acilação directa

Um exemplo do uso da biocatálise na indústria farmacêutica é sua aplicação na síntese de estatinas. A simvastatina atualmente é sintetizada a partir da lovastatina, que é um produto natural. De modo geral, o processo requer seis etapas como resultado da necessidade de proteger os grupos carboxila e hidroxila, seguida da desproteção (Figura 32). Uma síntese enzimática da simvastatina foi publicada a partir da lovastatina por transferência directa do grupo acil, por meio de *E. Coli*

recombinante que expressa uma aciltransferase (LovD), sendo obtida alta conversão (>99%) e alta pureza (>98%) (Figura 33) (TAO *et al.*, 2009).

A obtenção de enzimas em larga escala era um obstáculo para a implantação da biocatálise a nível industrial, devido ao alto custo e pela dificultada disponibilidade de compra. No entanto, após a década de 90, com o advento da engenharia molecular, a produção de proteínas em larga escala teve um salto. Hoje em dia, tem-se acesso a um grande número de enzimas, cujas propriedades biocatalíticas podem ser modificadas pelo emprego de técnicas de evolução dirigida (GONÇALVES *et al.*, 2013).

O biocatalisador pode ser uma célula inteira ou um extrato enzimático puro ou parcialmente purificado. O uso de enzimas puras ou parcialmente purificadas apresentam vantagens como alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos. No entanto, o uso de células integras, de modo geral, é mais barato e conveniente para sistemas enzimáticos que dependem de cofactor, pois a própria célula possui a maquinaria para promover a regeneração do mesmo (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

3.1. Classes de enzimas

As enzimas são classificadas em seis grandes grupos, baseadas na reação que elas catalisam (no número de ordem EC): Oxido-reductase, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (BOMMARIUS *et al.*, 2004, KRISHNA, 2002).

- Oxido-reductase (EC:1): Estas enzimas catalisam reacções de oxido-reducções, o que significa que elas atuam no substrato através da transferência de electrões. O nome sistemático da enzima é formado por *doador: acceptor: oxidoreductase*. O substrato que está a ser oxidado é considerado o doador de hidrogênio. O nome recomendado é geralmente *doador desidrogenase*. O termo *doador oxidase* é usado apenas quando o O₂ é o acceptor (MCDONALD *et al.*, 2000).

Algumas oxido-reductase são dependentes de co-factores, que serão reduzidos ou oxidados em contraposição ao substrato. Os cofactores mais comuns são NADH/NAD⁺ , NADPH/NADP⁺ , FADH/FAD⁺ , ATP/ADP e PQQ. Para conseguir aplicabilidade a nível industrial, devido ao alto custo, essas enzimas devem ter um eficiente sistema de regeneração de cofactor ou podem estar contidas em células inteiras (KRISHNA, 2002). O interesse por essa classe de enzimas tem crescido em escala industrial, principalmente devido à grandes demandas por processos de oxidação económicos e limpos e por produtos de oxidação altamente específicos e complexos. A engenharia enzimática tem contribuído para o melhoramento das características dessas enzimas, nomeadamente no campo da regeneração de cofactores (CIRINO *et al.*, 2002, LI *et al.*, 2002, URLACHER *et al.*, 2006).

- Transferases (EC:2): transferem um grupo a partir de um substrato (o dador) para outro (o aceitador). O nome sistemático é na forma *dador: aceitador: grupo transferase*. Os nomes recomendados são normalmente formados de acordo com o acceptor do grupo transferase ou dador do grupo transferase (MCDONALD *et al.*, 2000).

Estas enzimas são pouco usadas na indústria, pois muitas vezes não atingem rendimentos elevados devido a equilíbrios reacionais, os substratos de transferência de grupo são muito caros e/ou seus produtos correspondentes não são facilmente reciclados (KRISHNA, 2002).

- Hidrolases (EC:3): Estas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica de C-O, C-N, C-C e algumas outras ligações, incluindo anidrido fosfórico. Embora o nome sistemático seja *hidrolase*, o nome comum é, em muitos casos, formado pelo nome do substrato com o sufixo *ase* (MCDONALD *et al.*, 2000).

Algumas hidrolases atuam em ligações do tipo éster, glicosilo, peptídeo ou amida, e catalisam não apenas a remoção hidrolítica de um grupo particular dos substratos, mas da mesma forma a transferências desses grupos para moléculas aceitadoras adequadas. Em princípio todas as enzimas hidrolíticas podem ser classificadas como transferases, uma vez que a hidrólise em si pode ser considerada como a transferência de um grupo específico, cuja água é o aceitador (MCDONALD *et al.*, 2000). Elas podem ser divididas em três grupos: esterases (catalisam a hidrólise de ésteres), proteases (catalisam a hidrólise de peptídeos) e lipases (catalisam a hidrólise de acilgliceróis). Dentre todas as classes de enzimas, as hidrolases são as mais amplamente empregadas para biotransformações industriais. Estima-se que cerca de 80% de todas as enzimas usadas pela indústria sejam hidrolases (KRISHNA, 2002). As razões para este sucesso surgem da disponibilidade destas proteínas a partir de diferentes fontes comerciais a preços razoavelmente baratos, seu fácil manuseio (não são sensíveis e nem precisam de cofactores), sua estabilidade e versatilidade de ação (CARREA *et al.*, 2000).

As lipases serão tratadas especificamente, pois foram as enzimas usadas durante o desenvolvimento deste presente trabalho.

- Liases (EC:4): São enzimas que clivam ligações do tipo C-C, C-O, C-N, dentre outras. Atuam por eliminação, gerando duplas ou anéis, podendo ainda atuar inversamente adicionando grupos a ligações duplas. O nome sistemático é formado de acordo com o padrão: *substrato grupo-liase* (MCDONALD *et al.*, 2000).

As liases têm ganhado relevância a nível industrial devido a possibilidade de realizar reações reversas e formar ligações, atuando como *sintase* (KRISHNA, 2002).

- Isomerases (EC:5): Estas enzimas catalisam mudanças geométricas ou estruturais dentro da mesma molécula. De acordo com o tipo de isomerismo envolvido, elas podem ser chamadas de racemases, epimerases, *cis-trans*-isomerases, isomerases, tautomerases, mutases ou cicloisomerases (MCDONALD *et al.*, 2000). As Isomerases realizam alterações moleculares altamente seletivas e muitas vezes complexas; de particular interesse comercial é a isomerização de glicose para frutose catalisada pela glicose isomerase (DORDICK, 2013). Essas enzimas são amplamente usadas na produção de açúcares raros, devido à ampla especificidade para o substrato, podendo ser aplicadas na síntese de diversas aldoses e cetoses a partir de compostos mais baratos (BEERENS *et al.*, 2012).
- Ligases (EC:06): catalisam a ligação entre duas moléculas com a hidrólise concomitante de uma ligação de ATP em difosfato ou um trifosfato semelhante. O nome sistemático da enzima é *A:B ligase* (MCDONALD *et al.*, 2000). As ligações formadas são C-O, C-S e C-N. Estas enzimas não são usadas em grande escala, mas têm um papel importante na natureza (KRISHNA, 2002).

3.1.1. Lipases

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) atuam em ligações de ésteres carboxílicos, presentes em triacilgliceróis, libertando ácidos gordos e glicerol. O substrato natural das lipases são triacilgliceróis de cadeia longa, pouco solúveis em água; as reações são catalisadas na interface lípido-água. Sob condições micro-aquosas, as lipases apresentam a habilidade de realizar a reação reversa, levando a esterificação, alcoólise e acidólise (GUPTA *et al.*, 2004).

Uma característica das lipases é um fenômeno conhecido como 'ativação interfacial'. A ativação interfacial é caracterizada por um aumento da atividade da enzima em situações onde o substrato apresenta-se em micelas ou gotas de

emulsão. As lipases que apresentam esse comportamento não seguem o modelo de Michaelis-Menten (HARI KRISHNA *et al.*, 2002, REIS *et al.*, 2009) (Figura 34).

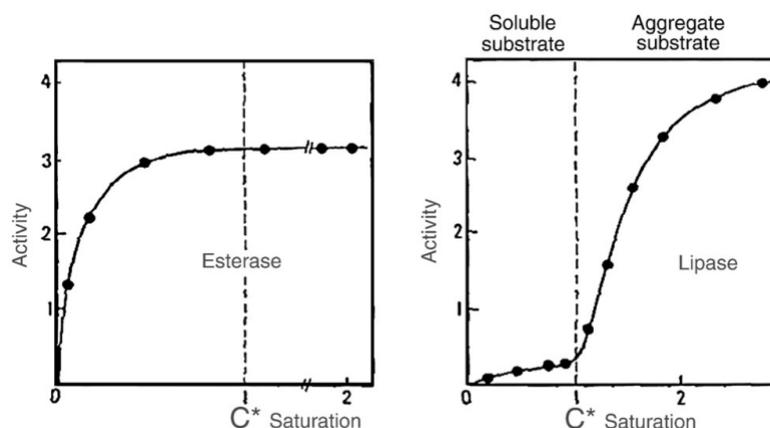


Figura 34. Hidrólise de triacentina pela lipase pancreática e esterase em função da concentração de substrato. As esterases seguem a lei de Michaelis-Menten, enquanto as lipases não. A atividade das lipases aumenta, pois acima do limite de solubilidade, o substrato apresenta-se sob a forma de micelas. Fonte: REIS e colaboradores (2009).

Os mecanismos propostos para explicar esse fenômeno, podem ser divididos em duas categorias: teoria do substrato e teoria do modelo enzimático (DAMODARAN, 2015). Levando em conta a teoria do substrato, atribui-se ao fenômeno de ativação interfacial à concentração, estado de hidratação e conformação do substrato na interface água/lípido. Entretanto, a extensão do aumento de 10^3 a 10^4 na taxa da atividade catalítica quando a enzima está em presença da interface, não pode ser justificada apenas por essas características (DAMODARAN, 2015).

Relativamente ao modelo enzimático, considera-se que a ativação interfacial decorra de uma alteração conformacional enzimática sob o ambiente de interface água/lípidos, a partir da forma fechada para a forma aberta do *lid* que recobre o sítio ativo (DAMODARAN, 2015, HARI KRISHNA *et al.*, 2002). Sendo esta questão suportada pela resolução de estruturas cristalinas de enzimas fúngicas e humanas, que mostram a presença de uma curta α -hélice anfipática (*lid*) que mantém o sítio ativo inacessível para o substrato. Na presença da interface água/lípidos, essa α -

hélice anfipática pode tornar o sítio ativo acessível ao substrato (DAMODARAN, 2015, REIS *et al.*, 2009).

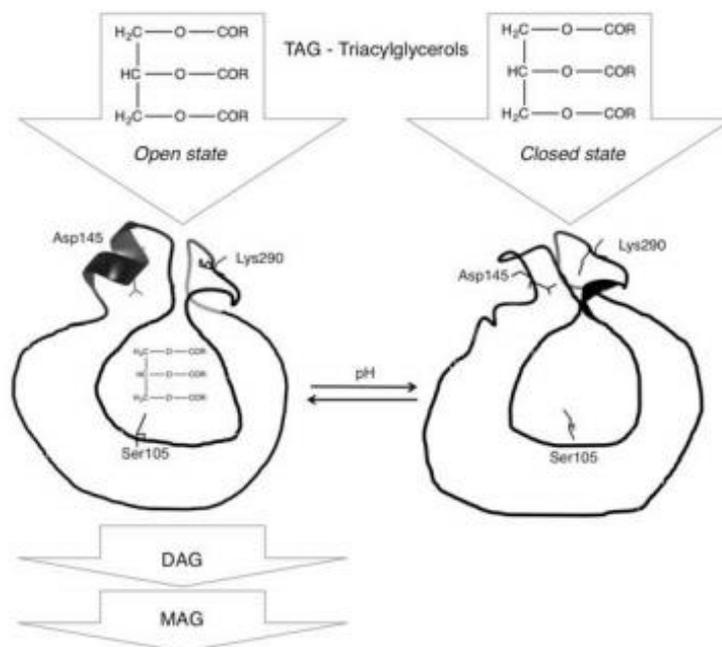


Figura 35. Mecanismo global de catálise da CALB. Uma molécula de triacilglicerol (TAG) é hidrolisada a diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG), quando a CALB está em estado aberto.

No entanto, nem todas as lipases apresentam esse comportamento. A lipase B obtida da *Candida antarctica* (CALB) não sofre 'ativação interfacial' (STAUCH *et al.*, 2015). Uma conformação fechada desta enzima nunca foi apresentada, sugerindo que a ausência de ativação interfacial advém da falta de um *lid* que regule o acesso ao sítio ativo (MARTINELLE *et al.*, 1995). No entanto, esta informação é contradita num trabalho desenvolvido por STAUCH *et al.* (2015), neste estudo é apresentado que a CALB tem α -hélice 5 e α -hélice 10 que mostram ser responsáveis por sua conformação fechada, em decorrência da formação de uma ponte salina entre o grupo carboxílico da Asp145 e a cadeia lateral da Lys290. Entretanto, o mecanismo pelo qual o *lid* recobre o sítio ativo não está relacionado com a interface água/lípidos, no caso da CALB o pH do meio é que desempenha esse papel (Figura 35). No pH 7, a CALB em solução apresenta oscilação entre a conformação fechada e a conformação aberta, sendo que a remoção do resíduo Asp145 a partir da α -hélice,

torna a atividade da enzima independente do pH, mostrando a estrita relação entre este novo *lid* apresentado e o pH do meio.

A interface água/lípidos influencia na reação catalisada naturalmente pelas lipases: a hidrólise de triacilgliceróis. No entanto, essas enzimas também são ativas em uma ampla variedade de substratos e também catalisam reações de síntese como esterificação e transesterificação (CASAS-GODOY *et al.*, 2012, REIS *et al.*, 2009, STERGIYOU *et al.*, 2013) (Figura 36).

a Esterification

Esterification



Amidation



Thioesterification

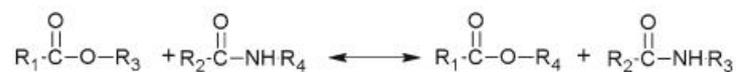


b Transesterification

Acidolysis reaction



Aminolysis reaction



Alcoholysis reaction



Interesterification reaction



Figura 36. Reações catalisadas por lipases. Fonte: CASAS-GODOY e colaboradores (2012).

As reações de síntese são realizadas em ambientes com baixa atividade de água. Lipases tem sido empregadas em experimentos usando álcoois primários e secundários ou ambos em sistema livre de solventes ou em solventes orgânicos. Dentre os importantes factores que influenciam o rendimento das esterificações estão a concentração da enzima e substrato, suas proporções molares, valor de pH e temperatura de reação, as taxas de mistura e o teor de água. Também é possível desenvolver reações de tio-esterificação e amidação, usando tiois ou aminas como substratos (CASAS-GODOY *et al.*, 2012, STERGIOU *et al.*, 2013).

As lipases apresentam um amplo potencial para a síntese química, pois aceitam uma grande quantidade de substratos, são bastante estáveis em solventes orgânicos, e assim podem ser usados para reações de hidrólise ou síntese de ésteres. Adicionalmente, reagem com vários tipos de triglicerídeos como ésteres aromáticos, bicíclicos, alicíclico, alifático e até mesmo ésteres à base de compostos organometálicos. Relativamente a ésteres racémicos ou substratos com muitos grupos hidroxilas, reagem com alta enantio e regioseletividade (SCHMID *et al.*, 1998).

Constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicação em biotecnologia. Tem sido aplicadas na síntese de biopolímeros e biodiesel, na produção de fármacos enantiomericamente puros, agroquímicos e compostos aromatizantes (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases podem ser obtidas de um grande número de fontes animais, vegetais, fúngicas e bacterianas. Suas propriedades podem variar de acordo com as fontes das quais são obtidas, apresentando diferentes especificidades de posicionamento, especificidades de ácidos graxos, termo-estabilidade e pH ótimo (HASAN *et al.*, 2006).

Seu sítio ativo é similar ao das proteases, sendo formado por uma tríade catalítica que consiste em um resíduo nucleofílico de serina, ativado por ligações de hidrogénio conectado a histidina e ácido aspártico ou ácido glutâmico (KAPOOR *et al.*, 2012, SCHMID *et al.*, 1998).

As lipases apresentam especificidade posicional, estereoquímica e de substrato. Tais especificidades serão detalhadas abaixo:

- *Regioespecificidade* (Especificidade de posição): As lipases podem ser de três tipos de acordo com sua capacidade em hidrolisar triglicerídeos.

- (i) **Não específicas:** catalisam as reações em todos os grupos hidroxilo dos triglicéridos e, portanto, podem eliminar o ácido gordo a partir de qualquer posição, apresentam mono e diglicerídeos como intermediários. São exemplos de lipases inespecíficas aquelas obtidas de *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Pseudomonas sp.* (HARI KRISHNA *et al.*, 2002, KAPOOR *et al.*, 2012, RIBEIRO *et al.*, 2011) (Figura 37).



Figura 37. Esquema geral para catálise de reações de lipases não específicas. Adpatado de KAPOOR e colaboradores (2012).

- (ii) **1,3 - Específicas:** Catalisam reações apenas em grupos hidroxilo primários de triglicerídeos. E assim libertam preferencialmente ácidos gordos a partir das posições 1 e 3, gerando di ou monoglicerídeos. São exemplos lipases obtidas a partir de *spergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus niveus*, and *Penicillium roquefortii* (HARI KRISHNA *et al.*, 2002, KAPOOR *et al.*, 2012, RIBEIRO *et al.*, 2011) (Figura 38).

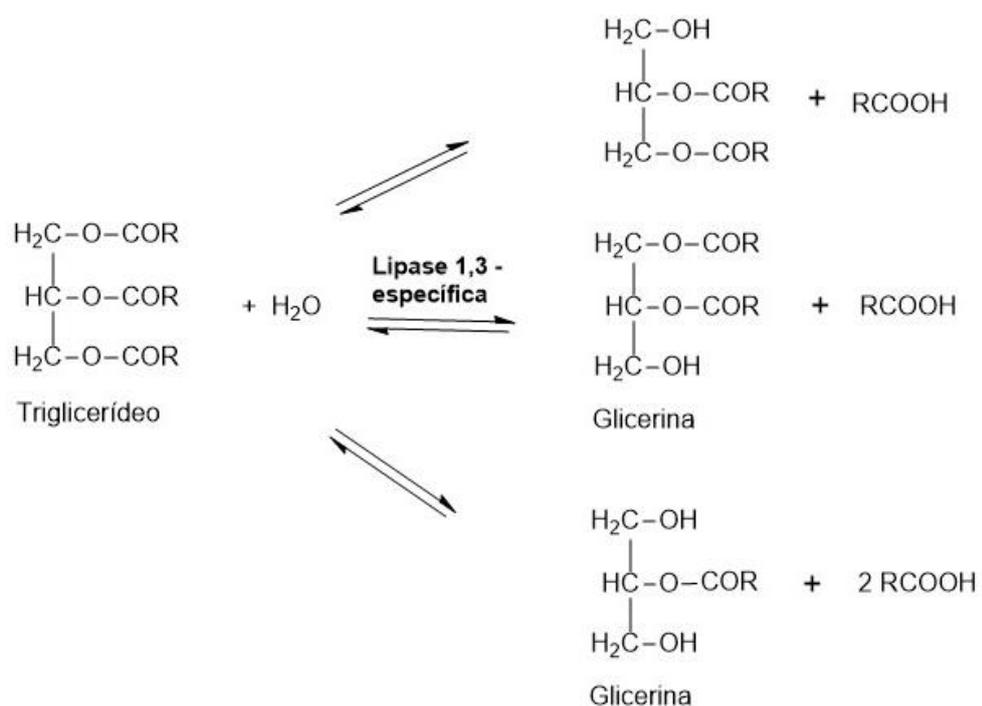


Figura 38. Esquema geral para reações catalisadas por lipase 1,3 – específicas. G, MG, DG e TG se referem a glicerol, monoglicerol, diglicerol e triglicerídeo, respectivamente. Adpatado de KAPOOR e colaboradores (2012).

- (iii) **Lipases específicas de ácidos gordos:** algumas lipases preferem a hidrólise de ésteres formados a partir de ácidos gordos de cadeia longa com ligações duplas entre C-9 e C-10. Ésteres insaturados ou sem ligação dupla no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e provavelmente o exemplo mais estudado deste caso é a lipase obtida a partir da *Geotrichum candidum* (HARI KRISHNA *et al.*, 2002, KAPOOR *et al.*, 2012, RIBEIRO *et al.*, 2011).

- *Especificidade de substrato:* as lipases mostram especificidade não apenas relativamente tipo de cadeia do ácido gordo, mas também relativamente a parte álcool do substrato (GANDHI *et al.*, 1995, KAPOOR *et al.*, 2012).

Algumas lipases mostram preferência por certos tipos de ácidos gordos ou grupos de ácidos gordos, por exemplo, a lipase de *Aspergillus flavus* mostra maior preferência por tricaprina do que a trioleína (LONG *et al.*, 1998). Lipases

a partir de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* tem maior preferência por ácido oléico do que por ácido eláidico, enquanto a lipase A obtida *Candida antarctica* prefere ácido eláidico do que ácido oléico (BORGDORF *et al.*, 1999) (Figura 39).

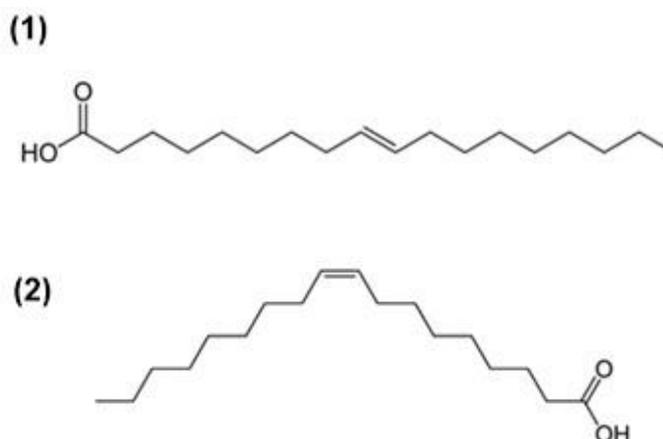


Figura 39. (1) Ácido Eláidico (ácido (E) -octadec-9-enóico) e (2) ácido Oléico (ácido (Z) -octadec-9-enóico). Lipases obtidas de *C. rugosa* e *R. miehei* têm preferência pelo ácido oleico, ao passo que lipases obtidas a partir de *C. antarctica* tem preferência pelo ácido eláidico.

A atividade das lipases também varia dentre os diferentes grupos de álcoois: álcool primário > secundário > terciário (KUO *et al.*, 1993). Álcoois terciários e seus ésteres não são bons substratos para lipases (O'HAGAN *et al.*, 1994).

- **Enantiosseletividade:** Muitas lipases tem mostrado alta estereosseletividade, e promovem a preparação de compostos enantiomericamente puros, através de resolução cinética ou resolução cinética dinâmica de racematos (DE MIRANDA *et al.*, 2015). Na resolução cinética de um racemato, um dos enatiómero interage com o catalisador quiral, enquanto o outro não consegue essa mesma interação, logo, na presença do catalisador quiral, um dos enatiómeros é convertido para o produto em uma taxa muito maior do que o outro (DE MIRANDA *et al.*, 2015) (Figura 40).

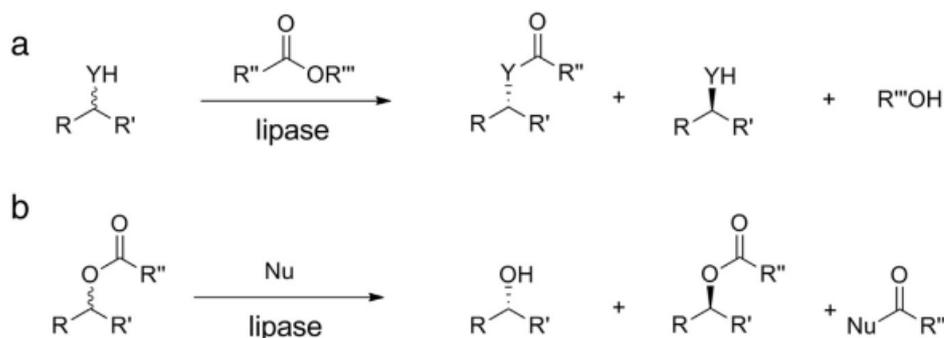


Figura 40. Reação de resolução cinética catalisada por lipase. (a) Resolução cinética de um racemato nucleofílico, (b) Resolução cinética de um éster racêmico. Y = NH, OH, Nu = OH, OR, NH₂. Fonte : DE MIRANDA e colaboradores (2015).

A enantiosseletividade das lipases é amplamente influenciada pelo meio reacional, que compreende características como o solvente orgânico, a atividade de água, a concentração do substrato e a estrutura do substrato. A modificação de tais parâmetros têm um papel importante e, de modo geral, altera a enantiosseletividade, particularmente devido a mudanças nos modos de ligação dos substratos enantioméricos (BERGLUND, 2001).

Constituem-se exemplos da aplicação de lipases pela indústria farmacêutica, a resolução cinética de intermediários da síntese do paclitaxel, crizotinib, pregabalina, ezetimibe, naproxeno, cetoprofeno; e a acilação estereosseletiva de intermediários na síntese de pimecrolimus, loxoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetorolaco, cloranfenicol, e tianfenicol, duloxetine, nebracetam, dentre outros (CARVALHO *et al.*, 2015) (Figura 41).

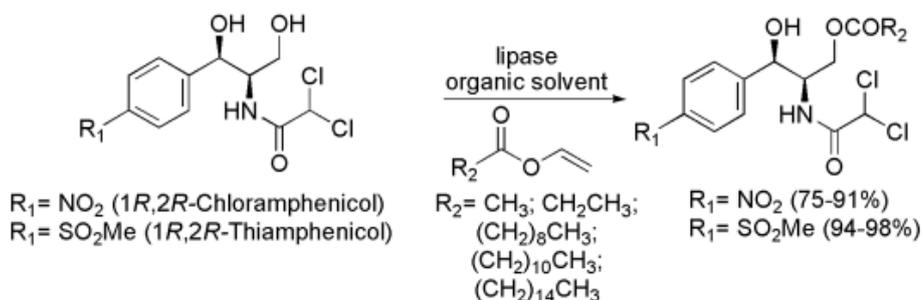


Figura 41. Exemplo do uso de lipases para acilação regioseletiva. Acilação do cloranfenicol e tianfenicol com o intuito de melhorar o gosto amargo. Fonte: CARVALHO e colaboradores (2015).

3.1.1.1. Mecanismo catalítico das serina- hidrolase

O sítio ativo das lipases está localizado no interior de um bolso na parte superior do folha- β central da estrutura proteica. A superfície do bolso é coberta por resíduos hidrofóbicos que interagem com o substrato que comumente é hidrofóbico (CASAS-GODOY *et al.*, 2012). O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico/ácido glutâmico. O sítio ativo tanto das lipases quanto da serino proteases são quimicamente similares, mas estruturalmente distintos. O grupo seril hidroxila nas lipases não está orientado da mesma forma que nas serino proteases, resultando em uma estereoquímica invertida da tríade catalítica (KAPOOR *et al.*, 2012).

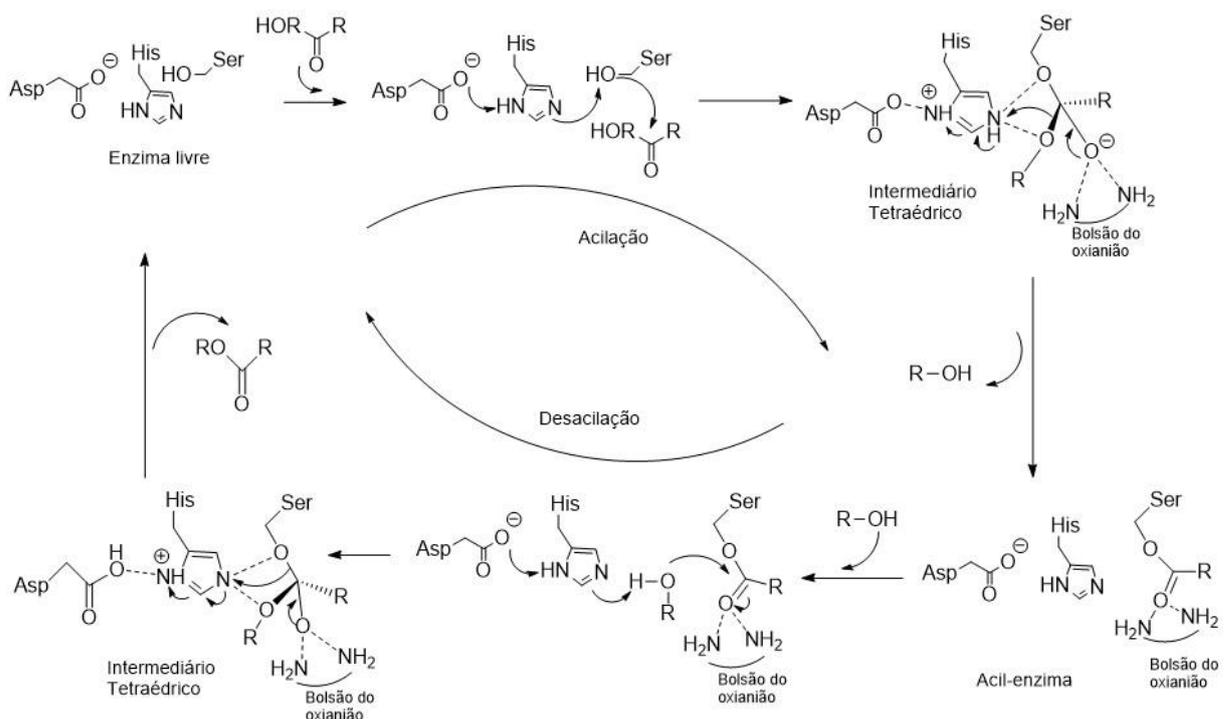


Figura 42. Mecanismo catalítico das lipases. Adaptado de CASAS GODOY e colaboradores (2012).

Como pode ser observado na figura 42, o mecanismo se inicia com uma acilação. Esta etapa consiste na transferência de um próton entre o aspartato, a histidina e o resíduo de serina da lipase, causando ativação do grupo hidroxila da serina catalítica. Como consequência, o resíduo hidroxila da serina, com subsequente

aumento de nucleofilicidade, ataca o grupo carbonilo do substrato. O primeiro intermediário tetraédrico é formado com uma carga negativa no oxigênio do grupo carbonilo. Resíduos presentes na cavidade do oxianião estabilizam a distribuição de carga e reduzem o estado energético do intermediário tetraédrico através da formação de, pelo menos, duas ligações de hidrogênio. Em seguida ocorre o passo de desacilação, onde um nucleófilo ataca a enzima, libertando o produto e regenerando a enzima. Este nucleófilo pode ser água no caso de hidrólise ou um álcool no caso de alcoólise (BORRELLI *et al.*, 2015, CASAS-GODOY *et al.*, 2012).

O mapeamento eletrostático mostra que muitas lipases e esterases apresentam um sítio ativo carregado negativamente na faixa ótima de pH (6-10), assim depois da clivagem do éster, o ácido carboxílico é imediatamente expelido para fora do sítio ativo devido a repulsão eletrostática entre o seu grupo carboxilo carregado negativamente e o potencial eletrostático negativo do sítio ativo (ANOBOM *et al.*, 2014).

3.1.2. Biocatálise em solventes orgânicos

Existe um interesse crescente na catálise enzimática a nível industrial, desenvolvida em solventes orgânicos. Os sistemas de biotransformação em meio aquoso geralmente são menos atrativos, pois estão relacionados a maiores custos no processo de purificação, devido ao alto ponto de ebulição da água, além de possibilitar reacções indesejadas como hidrólise, racemização, polimerização e decomposição (KUMAR *et al.*, 2016).

Outras vantagens relacionadas ao uso de solventes orgânicos em catálise química estão a alta solubilidade de compostos hidrofóbicos, redução ou ausência da contaminação por microrganismos, modificação da especificidade da enzima para substratos particulares, facilidade de recuperação e reutilização da enzima, possibilidade de melhorar a termoestabilidade e viabilidade da catálise de reacções que seriam impraticáveis em meio aquoso (SALIHU *et al.*, 2015).

Solventes completamente anidros não são capazes de manter a atividade enzimática, pois são necessárias pequenas quantidades de água para manter a estrutura nativa responsável pela catálise (HARI KRISHNA *et al.*, 2002).

Contudo, a maioria das enzimas mostram redução da eficiência catalítica em solventes orgânicos, quando comparada com a solução aquosa nativa (STEPANKOVA *et al.*, 2013). A imobilização de enzimas é o método mais comumente usado para melhorar a estabilidade enzimática em solventes orgânicos, contribuindo para maior rigidez conformacional, impedindo o desdobramento da enzima e a malformação do seu sítio ativo. Um método simples de imobilização é a adsorção física de enzimas sobre um material de suporte, um dos exemplos mais conhecidos é a lipase B de *Candida antarctica* adsorvida em resina de permuta iônica, que exibe excelente atividade em solventes orgânicos (Novozym 435) (STEPANKOVA *et al.*, 2013).

Dentre as enzimas usadas em solventes orgânicos, a lipase tem um papel de destaque, pois apresenta maior atividade e estabilidade do que a maioria das enzimas (ADLERCREUTZ, 2013). A partir da década de 80 seu uso se expandiu, sendo empregada em reações de esterificação e transesterificação, além das tradicionais reações de hidrólise (ADLERCREUTZ, 2013).

As diferentes lipases apresentam comportamentos diversos em solventes orgânicos. Além do log P, parâmetros como constante dielétrica, momento dipolo, ligações de hidrogênio e polarizabilidade afetam a atividade e estabilidade enzimática em solventes orgânicos. Geralmente as lipases são mais estáveis em solventes imiscíveis em água do que em solventes miscíveis em água (KUMAR *et al.*, 2016).

Como exemplo de sucesso no uso de solventes orgânicos na biocatálise, pode-se citar a lipase A12, obtida a partir de *Aspergillus niger*, que catalisa a acetilação da celulose em meio aquoso com rendimentos muito baixos. No entanto, quando essa atividade enzimática é testada em solventes orgânicos (dimetil sulfóxido / paraformaldeído), a extensão da acetilação aumenta mais de 50 vezes. A melhoria na atividade foi atribuída ao aumento da solubilidade do substrato, bem como a capacidade da lipase A12 em manter a atividade em DMSO (YANG *et al.*, 2003).

Parte II

Objetivos

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a atividade anti-inflamatória e citotoxicidade de novos derivados acilados da naringina, rutina e polidatina, obtidos por catálise enzimática e realizar estudos de relação estrutura/atividade.

4.2. Objetivos Específicos

1. Conhecer técnicas de acilação enzimática de polifenóis a partir de lipases.
2. Realizar a semi-síntese de derivados de polifenóis glicosilados, fazendo uso de lipases.
3. Conhecer técnicas de cultura celular e testes *in vitro* utilizando a linha celular de macrófagos Raw 264.7.
4. Avaliar a atividade anti-inflamatória, especificamente a inibição da produção de óxido nítrico, da naringina, rutina, polidatina e seus derivados acilados em macrófagos estimulados por LPS.
5. Comparar o efeito de polifenóis de origem natural e seus derivados semi-sintéticos na produção de óxido nítrico.
6. Avaliar o efeito citotóxico da naringina, rutina, polidatina e seus derivados acilados.
7. Comparar o efeito citotóxico entre os polifenóis de origem natural e seus derivados semi-sintéticos.
8. Avaliar a atividade antioxidante da naringina, rutina, polidatina e seus derivados acilados, relativamente ao óxido nítrico, através do dador de NO SNAP.
9. Avaliar a expressão da enzima sintase do óxido nítrico sob influência de derivados acilados dos flavonóides naringina e rutina.
10. Estabelecer relações estrutura-atividade.

Parte III

Materiais e métodos

5. Parte experimental

5.1. Semi-síntese de polifenóis acilados por biocatálise

Os compostos polifenólicos foram preparados como descrito por Edmilson António Borges Semedo, em seu trabalho de mestrado apresentado a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (SEMEDO, 2015), os dados analíticos obtidos estão de acordo com o descrito previamente. Apenas o cinamato de polidatina foi preparado pela primeira vez (Tabela 9).

Tabela 9. Derivados semi-sintéticos de polifenóis obtidos por catálise enzimática.

Derivados de polifenóis obtidos por biocatálise
Derivados da Polidatina
3'',6''- Dibutirato de polidatina
6'' -Cinamato de polidatina
Derivados da Naringina
6''- Acetato de naringina
4'''- 6''-Diacetato de naringina
6'' – Butirato de naringina
Derivados da Rutina
3''-4'''-Diacetato de Rutina
3''-4'''- Dipropianato de Rutina

5.1.1. Síntese regioseletiva de ésteres de polifenóis glicosilados

5.1.1.1. Instrumentação

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H), foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 400, a 400 MHz. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C), foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III de 100 MHz. A caracterização de carbonos metílicos,

metilénicos e quaternários foi efectuada por DEPT. Os desvios químicos são dados na escala δ (ppm) e são relativos ao dimetilsulfóxido deuterado como solvente.

As reacções enzimáticas foram efectuadas num agitador orbital New Brunswick Scientific, C24 Incubator Shaker, a 45°C, 48°C e 52°C a 175 rpm.

5.1.1.2. Reagentes e solventes

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

Os substratos naringina e rutina foram obtidos da TCI, enquanto que a polidatina foi obtida da Sigma-Aldrich Co., Clorofórmio e metanol foram obtidos da CARLO EBRA Reagents. Acetona, sílica gel 60 (cromatografia em coluna) e CCF sílica gel 60 F254 foram obtidos da Merck Co., cinamato de vinilo, acetato de vinilo, butirato de vinilo, acetato de etilo, propionato de vinilo e as lipases foram obtidos da Sigma-Aldrich Co.

Foram utilizadas as seguintes enzimas: Amano Lipase a partir de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma-Aldrich Co.), lipase em resina acrílica a partir de *Candida antarctica*/ Novozyme 435® (Sigma-Aldrich Co.) e amano Lipase AYS (Sigma-Aldrich Co.).

5.1.1.3. Acilação enzimática da polidatina

Num ensaio de rastreio, soluções de polidana (5mg) em acetona (0,5 ml) e cinamato de vinilo (0,1 ml) foram adicionadas às enzimas Novozym 435®, Amano Lipase AYS e Lipase de *Candida rugosa* (5 mg) em frascos de 3 ml. Os frascos foram fechados e as suspensões foram agitadas a 175 rpm a 45°C. As reacções foram monitorizadas por cromatografia em camada fina (CCF) durante 48 horas. A única que mostrou formação de produto por CCF foi a catalisada pela Novozyme 435®, sendo então essa reacção feita em maior escala.

A uma solução de polidatina (40 mg; 0,1 mmol) em acetona (1,4 mL) e cinamato de vinilo (0,2 mL; 1,14 mmol) foi adicionada Novozyme 435® (14mg), a mistura reaccional foi agitada a 45°C (5 dias), 48°C (2 dias), 52°C (1 dia) e 45°C (4 dias), em um total de 12 dias de reação, sempre monitorada por CCF usando a mistura clorofórmio/acetona/metanol (75: 15: 30) como eluente.

Após o término da reação. A enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por último, o cinamato de polidatina foi isolada por cromatografia em coluna, usando como fase móvel: clorofórmio/acetona/metanol (75:20:20) . Após essa etapa o solvente foi novamente evaporado e o derivado da polidatina foi colocado para secar em estufa sob pressão reduzida.

5.1.2. Análise estrutural dos derivados de polifenóis

Os produtos obtidos foram identificados por meio de análises de RMN¹H, nomeadamente a partir do desvio químico dos sinais relacionados ao próton do carbono ligado ao hidroxilo acilado. Além de análises RMN ¹³C e DEPT 135 (o sinal na zona dos 2,5 ppm nos espectros RMN ¹H é relativo ao dimetilsulfóxido deuterado, bem como o sinal na zona dos 39,502 ppm nos espectros RMN ¹³C) (SEMEDO, 2015).

Ao comparar os espectros de RMN ¹H do produto da acilação enzimática da polidatina com butirato de vinilo, observou-se o aparecimento de um duplo dubleto, a δ H 5,53 ppm e δ H 4,96 ppm, correspondente à primeira e à segunda posição de acilação, respectivamente. Observou-se também quatro sinais a δ H 2,33 ppm, δ H 2,24 ppm, δ H 1,59 ppm e δ H 1,46 ppm correspondentes a grupos CH₂ do butirato, além de dois tripletos a δ H 0,93 ppm característicos de grupos metílicos do butirato. Essas observações foram confirmadas pela análise do espectro de RMN ¹³C, onde aparecem dois novos sinais a 172,16 ppm e 172,63 ppm referentes a grupos carbonilo das novas ligações éster, além de quatro sinais a 35,65 ppm, 35,23 ppm, 18,01 ppm e 17,84 ppm característicos de grupos CH₂ do butirato, e de dois sinais a 13,46 ppm e 13,28 ppm relativos a grupos CH₃ do butirato. Em comparação com a

molécula de polidatina, os sinais atribuídos ao C-6 e ao C-3 da glicose sofreram uma alteração, sugerindo a presença de ligações éster nessas posições. A análise do DEPT 135 corroborou com os resultados obtidos para o RMN ^{13}C (SEMEDO, 2015).

Foram biossintetizados três produtos pela acilação da naringina: Acetato de naringina, butirato de naringina e diacetato de naringina. Ao analisar os espectros de RMN ^1H dos três compostos, pode-se observar alterações nos sinais dos hidrogénios da porção açúcar, mas os resultados não foram suficientes para determinar as posições da acilação dessas moléculas. A análise do espectro de RMN ^{13}C do produto de reação da monoacilação enzimática da naringina com butirato de vinilo, permite observar o aparecimento de sinais a 13,30 ppm, 17,78 ppm e 35,18 ppm característicos de grupos metílicos e etílicos do butirato, além do sinal a 172,59 ppm relativo ao carbono carbonilo. Notam-se alterações nas posições C-6 e C-5 da glicose, evidenciando a presença de uma ligação éster na posição C-6 da glicose. O espectro DEPT 135 permitiu concluir que o sinal a 172,59 ppm é relativo a um carbono quaternário, que o sinal a 13,30 ppm é relativo a um grupo metílico e que os sinais a 17,78 ppm e 35,18 ppm correspondem a grupos etílicos do butirato. Análises semelhantes foram feitas para os derivados acetato e diacetato de naringina (SEMEDO, 2015).

A partir da rutina foram sintetizados, por catálise enzimática, dois derivados diacilados, o 3''-4'''-diacetato de rutina e o 3''-4'''- dipropianato de rutina. Na análise do espectro de RMN ^1H do produto da acilação enzimática da rutina com acetato de vinilo, apareceram dois novos tripletos centrados a δH 4,62 ppm e δH 4,84 ppm que correspondem às duas regiões de acilação da porção açúcar. Também se observou a entrada de dois singuletos a δH 2,05 ppm e a δH 1,90 ppm referentes a grupos metílicos. Ao analisar o espectro do RMN ^{13}C , verificou-se o surgimento de sinais a 20,73 ppm e 21,10 ppm referentes a carbonos metílicos e os sinais a 169,72 ppm e 170,04 ppm referentes a carbonos carbonilo. Quando comparado à molécula da rutina, o sinal referente ao C-4 da rammose (δH 73,55) sofreu uma mudança na ordem de 1,71 ppm. O sinal a 77,49 ppm atribuído ao C-3 da glicose sofreu uma alteração de 1,05 ppm relativamente ao substrato rutina (δH 76,44 ppm). Estes dados sugerem a

presença de ligações éster nas posições C-4 da ramnose e C-3 da glicose, elucidando assim as posições de acilação do composto (SEMEDO, 2015). Análise semelhante foi feita para o dipropionato de rutina.

5.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.2.1. Modelo biológico: macrófagos

As células RAW 264.7, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC® TIB71™), são uma linha celular de macrófagos vulgarmente utilizada em investigação na área das ciências da saúde, particularmente em estudos de inflamação. Foi originalmente obtida a partir da ascite induzida por tumor, formado após injeção do vírus da leucemia Abelson (A-MuLV) em ratinhos machos (HARTLEY *et al.*, 2008).

Esta linha celular é comumente usada para testes de atividade inflamatória e foi escolhida pela *Alliance for Cellular Signaling* como um modelo experimental relevante para estudos de vias de sinalização intracelular em larga escala (BERGHAUS *et al.*, 2010, BUCZYNSKI *et al.*, 2007, HARTLEY *et al.*, 2008, NORRIS *et al.*, 2011).

5.2.2. Meio de cultura celular

Para a cultura das células Raw 264.7 utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) numa concentração de 10g/L, suplementado com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 3,5g/L de D- glicose, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino (SFB) não inativado. Este meio é mantido a 4°C, sendo pré-aquecido a 37°C antes de entrar em contacto com as células.

5.2.3. Cultura de células

As células RAW 264.7 são criopreservadas numa solução contendo 500 µL de meio de cultura suplementado, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 400 µL de soro

fetal bovino. Para os ensaios de estimulação *in vitro*, as células foram descongeladas e transferidas para frascos de cultura de tampa com filtro (75 cm²) contendo o meio DMEM suplementado e foram mantidas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO₂. A cada 2 dias, cerca de 10-20% das células são transferidas para outro frasco de cultura contendo 10 mL de meio DMEM suplementado e são novamente colocadas na incubadora a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO₂.

A morfologia das células foi monitorizada regularmente por observação ao microscópio. As células foram utilizadas nos ensaios biológicos quando apresentavam 80-90% de confluência.

A contagem global do número de macrófagos RAW 267.4 foi realizada na câmara de *Neubauer*, utilizando azul de tripano. Em todas as experiências, as células foram cultivadas em placas de cultura *overnight* antes dos tratamentos.

5.2.4. Produção de óxido nítrico (NO)

Com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória dos polifenóis glicosilados naringina, rutina e polidatina e seus 7 derivados, foi usada a linha celular de macrófagos Raw 264.7 ATCC® TIB-71™.

A produção de óxido nítrico foi avaliada indiretamente pela deteção da acumulação de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares, utilizando uma reação colorimétrica com recurso ao reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982). A reação de Griess é um antigo método de deteção de nitritos desenvolvido por Johann Peter Griess em 1879. Esta técnica consiste na reação de uma mistura em meio ácido de sulfanilamida, 1-naftilenodiamina e nitritos, gerando um cromóforo de coloração rosa com diferentes intensidades que identifica e quantifica a concentração aproximada de iões nitrito (CONESKI *et al.*, 2012) (Figura 43).

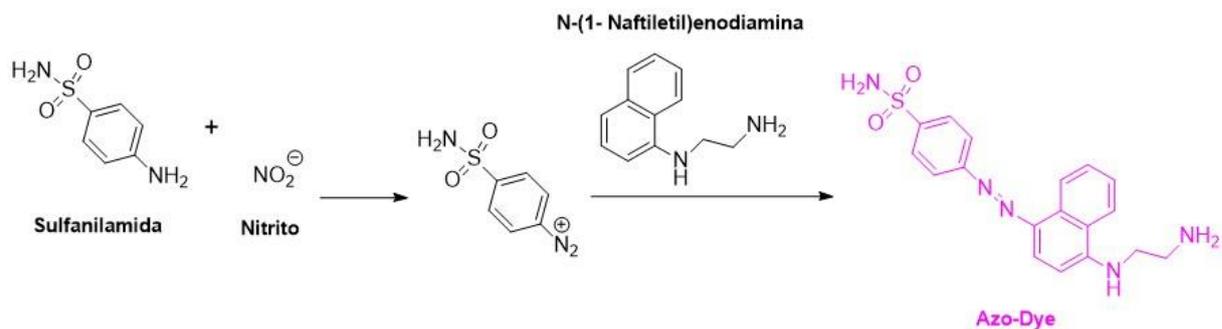


Figura 43. Reação de Griess. Adaptado de CONESKI e colaboradores (2012).

Os macrófagos foram cultivados em microplacas de 96 poços (MW 96), numa densidade de $0,1 \times 10^6$ células/ 300 μ L, e deixados a estabilizar para adesão aos poços, *overnight*, numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO₂.

Após a estabilização, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 300 μ L de meio de cultura aos poços. Os compostos foram dissolvidos em etanol ou meio em concentrações variadas (Tabela 10), das quais diferentes concentrações foram adicionadas a cada poço. Após 1 hora, as células foram ativadas com 50 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) durante 24 horas, a 37° C com 5% de CO₂.

Após 24 h, 170 μ L de sobrenadante da cultura foram diluídos com igual volume de reagente de Griess (preparado numa proporção (1:1) de reagente A e reagente B, estáveis a 4°C, figura 44) numa microplaca Elisa de 96 poços. A placa foi mantida ao abrigo da luz, durante 30 minutos e à temperatura ambiente. A Absorvância foi lida a 550 nm num espectrofotômetro. A concentração de nitritos foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos relativamente às células estimuladas com LPS (50 ng/mL).

Tabela 10. Polifenóis e derivados testados. Todos os compostos foram dissolvidos em etanol, exceto a Rutina e derivados, que foram dissolvidos em meio de cultura.

Compostos polifenólicos	Concentrações testadas (µM)
Polidatina	300 – 200 -100 – 50 – 25
3'',6''- Dibutirato de polidatina	300 – 200- 100- 50 – 40 -25- 20-10-1
6'' – Cinamato de polidatina	300 – 200 -100 – 50 – 25
Naringina	400 – 200 -100 – 50 – 25
6''- acetato de naringina	400 – 200 -100 – 50 – 25
4''-6''- Diacetato de naringina	250 – 200 -100 – 50 – 25
6''- Butirato de Naringina	400 – 200 -100 – 50 – 25
Rutina	300 – 200 -100 – 50 – 25
3''-4'''- Diacetato de rutina	300 – 200 -100 – 50 – 25
3''-4'''- Dipropianato de rutina	300 – 200 -100 – 50 – 25

REAGENTE DE GRIESS

Reagente A: Sulfanilamida 1% (p/v) em Ácido Fosfórico 5% (v/v)

Dissolver 1g de sulfanilamida em 100mL de uma solução aquosa contendo ácido fosfórico a 5% (2,485mL Ác. Fosfórico em 97,515mL H₂O). Guardar a 4°C em frasco escuro

Reagente B: N-1-naftilenodiamina 0,1% (p/v) em H₂O. Guardar a 4°C em frasco escuro

Figura 44. Modo de preparação do reagente de Griess usado nas experiências.

5.2.5. Teste de viabilidade celular (resazurina)

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos foi usado um teste conhecido como *Alamar Blue*, que faz uso da resazurina como indicador de oxidação-redução. Este teste é considerado seguro, barato e sensível (PAGE *et al.*, 1993).

A atividade metabólica intrínseca das células promove a redução da resazurina, em que as células vivas reduzem o composto enquanto as células inativas mantêm o composto oxidado. A redução faz com que o indicador REDOX deixe de ser não fluorescente (azul) e passe a ser fluorescente (Rosa) (PAGE *et al.*, 1993) (Figura 45).

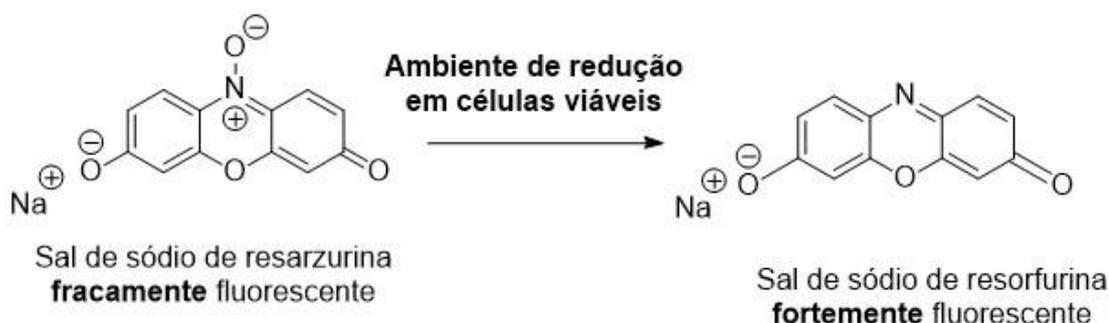


Figura 45. Reação da resazurina no teste de citotoxicidade *alamar blue*.

Após a recolha de 170 μL de sobrenadante para o teste de produção de NO, o meio de cultura da placa (MW 96) é aspirado completamente. São adicionados a cada poço 150 μL de uma mistura contendo meio DMEM suplementado com 10% de resazurina. Após 60 minutos é feita a leitura no espectrofotômetro a 570 e 620 nm.

Todos os resultados foram expressos em percentagem relativamente ao controlo contendo apenas células e meio.

5.3. Deteção da atividade *scavenging*

Para avaliar se a diminuição da produção de óxido nítrico induzida pelos polifenóis decorre da acção anti-oxidante do mesmo, foi feito um teste usando uma substância "doadora de NO", o SNAP (S-nitroso-n-acetil D-L- penicilamina) (FIELD *et al.*, 1978). Uma vez em solução, este composto tem a capacidade de libertar moléculas de NO para o meio, que rapidamente origina o seu metabolito, o nitrito (MATHEUS *et al.*, 2003).

Numa microplaca de 48 poços adicionaram-se 300 μL de meio contendo os extratos, e de seguida 300 μM de SNAP. A solução foi deixada na incubadora a 37°C,

durante 3 horas. Para fazer a leitura dos níveis de nitritos, após os tratamentos, utilizou-se o reagente de Griess (conforme descrito na seção 5.3.4).

5.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) de pelo menos 3 experiências. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado através da análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*), seguida do pós teste de *Dunnett's*. Os valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados como representando diferenças significativas. As análises estatísticas foram aplicadas usando o programa GraphPadPrism, versão 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.5. Detecção de iNOS

5.5.1. Obtenção dos lisados totais

5.5.1.1. Cultura de células

Os macrófagos foram cultivados em microplacas de 24 poços (MW 24), numa densidade de $0,6 \times 10^6$ células/ 2000 μ L, e deixados a estabilizar *overnight*, numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO₂.

Após a estabilização, o meio foi removido e foram adicionados 2000 μ L de meio de cultura aos poços. Foram testados o butirato de naringina (400 μ M) e o dipropionato de rutina (300 μ M), cujos veículos foram, respectivamente, etanol e meio de cultura. Foi feito um controlo para o veículo etanol (0,8%).

Após 1 hora, as células foram ativadas com 1 μ L/mL de lipopolissacarídeo (LPS), na presença ou ausência dos compostos em estudo, durante 24 horas, numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO₂.

5.5.1.2. Preparação do tampão RIPA

O tampão RIPA, previamente preparado e guardado a 4°C, é constituído por 50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS e 2 mM EDTA. Para a realização das experiências, o tampão RIPA foi descongelado e foi suplementado com um *cocktail* inibidor de proteases na proporção de 7 : 1 (RIPA : Inibidor de proteases), e um inibidor de fosfatases na proporção de 10 : 1 (RIPA : Inibidor de fosfatase) e 1 mM de DTT na proporção de 1 : 1000.

5.5.1.3. Lisados totais

Após 24 horas de tratamentos, a placa de cultura celular foi recolhida em gelo. As células aderentes foram então lavadas com 1 ml de PBS. Imediatamente após a lavagem foram adicionados aos poços 80 µl de tampão RIPA suplementado. Fez-se então a raspagem das células e a suspensão resultante (tampão RIPA + células) foi recolhida para microtubos arrefecidos. As amostras foram então sonicadas a 3 x 40 µm x 4s, sempre mantendo os microtubos arrefecidos. Após a sonicação, a suspensão celular foi centrifugada a 12000g durante 10 minutos, a 4°C, sendo então recolhido o sobrenadante. As amostras resultantes foram congeladas à - 80°C.

5.5.2. Quantificação da proteína de extratos celulares pelo método do ácido bicinonínico (BCA)

Segundo SMITH e colaboradores, o método de quantificação da proteína de extractos celulares pelo ácido bicinonínico baseia-se na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, sendo produzido o cobre (I). O Cu^{+1} forma um complexo com o BCA, gerando uma coloração azul/roxa, que absorve fortemente na região de 570 nm (ZAIA *et al.*, 1998). A cor produzida a partir desta reação é estável e aumenta de forma proporcional ao longo de um amplo intervalo de concentrações crescentes de proteína (SMITH *et. al.*, 1985).

Inicialmente, as amostras foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços e diluídas: 2,5 µl de lisados totais + 22,5 µl de água miliq; 2,5 µl RIPA + 22,5 µl de água miliq (controlo do efeito do RIPA). A essa mistura foram adicionados 200 µl do reagente contendo sulfato de cobre II a 4% e ácido bicinconínico (na proporção de 1:50). A microplaca foi incubada durante 30 minutos a 37°C.

As Absorvâncias das amostras foram lidas a 570 nm no espectrofotômetro. A concentração de proteína foi calculada usando uma curva padrão de albumina bovina sérica (BSA) (Tabela 11).

Tabela 11. Preparação dos padrões de BSA a partir de uma solução *stock* com a concentração de 2000 µg/mL.

	BSA, µg/mL	Volume de BSA (µL)	Volume de H ₂ O (µL)
A	2000	Stock	-
B	800	80 de A	120
C	400	100 de B	100
D	200	100 de C	100
E	100	100 de D	100
F	50	100 de E	100
G	25	100 de F	100
H	12,5	100 de G	100

5.5.3. Desnaturação da amostra

Aos extractos celulares foi adicionada a solução desnaturante*, previamente preparada e armazenada a – 20°C , fazendo a diluição de 1:1. A mistura foi aquecida a 100 °C durante 5 minutos.

**Solução desnaturante:*

- 0,25 M Tris pH 6.8
- 4 % SDS
- 200 mM DTT
- 20 % Glicerol
- Azul de bromofenol

5.4.4. Eletroforese e electrotransferência

Após a desnaturação, 30 µg/mL de proteínas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em geis com 10% de poliacrilamida, durante 1 hora a 130 V, de acordo com o procedimento descrito por LIBERAL e colaboradores (2014). As proteínas do gel foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilidene (PVDF). A membrana de PVDF foi previamente ativada em metanol durante 5 minutos, seguindo-se de água, sob agitação, durante outro período de 5 minutos. Posteriormente, a membrana foi mantida sob agitação, em tampão de transferência até à sua utilização.

A fim de impedir as ligações não específicas dos anticorpos, as membranas foram então bloqueadas, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com 5% de leite magro em tampão tris salino (TBS) com Tween-20 na concentração de 0,1% (TBS-T), sob agitação suave.

Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C, sob agitação suave, com anticorpos primários para a iNOS (1 : 1000, R&D Minneapolis, MN, USA) e tubulina (1: 20000, Sigma).

Após lavagem durante 30 minutos com TBS-T, as membranas foram então incubadas com anticorpos secundários anti-mouse (1 : 20.000, GE Healthcare), diluídos em TBS-T com 1% de leite magro, durante 1 hora, à temperatura ambiente,

sob agitação suave. Após a incubação, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T. Os imunocomplexos foram revelados com o reagente ECF (Enhanced chemifluorescence). Para as leituras utilizou-se o varredor de imagens TYPHOON. A expressão de proteínas foi analisada através do programa TotalLaB TL120.

Parte IV

Resultados e discussão

6. Síntese regioseletiva de ésteres de polifenóis glicosilados

Os derivados acilados dos polifenóis foram preparados de acordo com a metodologia descrita por SEMEDO (2015). Enquanto que o cinamato de polidatina foi preparado pela primeira vez, a fim de testar a influência do aumento da lipofilicidade na citotoxicidade da polidatina, uma vez que só tínhamos testado um único composto, o dibutirato de polidatina.

Para a semi-síntese do cinamato de polidatina, foram testadas três enzimas: Amano Lipase a partir de *Pseudomonas fluorescens*, lipase em resina acrílica a partir de *Candida antarctica* (Novozym 435[®]) e amano Lipase AYS. As lipases foram avaliadas por suas capacidades de esterificar os substratos polifenólicos, usando cinamato de vinilo como substrato. A acetona foi o solvente escolhido, pois no trabalho desenvolvido por Edilson Semedo, apresentou o melhor resultado para a polidatina (SEMEDO, 2015). A monitorização foi feita por cromatografia em camada fina, durante 48 horas.

O melhor resultado foi obtido com a enzima Novozym 435[®], levando a uma preparação em maior escala desta reação. O tempo de reação foi de 12 dias. O andamento da reação foi monitorado por cromatografia em camada fina. Foi obtido produto em quantidades apreciáveis. A identificação foi feita por análise de RMN¹H, nomeadamente através do desvio químico dos sinais devidos ao próton ligado ao carbono ao qual se liga o hidroxilo acilado, análise RMN ¹³C.

Por conter muitos grupos hidroxilo (2 fenólicos, 1 primário e 3 secundários), reações de esterificação com a polidatina exigem regioseletividade. O grupo hidroxilo primário da glicose, na posição C-6'', é a região da molécula mais desimpedida e, portanto, suscetível de sofrer acilação. A segunda melhor posição de acilação nessa molécula é a C-3'' (Figura 46).

A reação de acilação da polidatina gerou um único produto, visível por CCF e facilmente isolado por coluna cromatográfica. A análise estrutural deste produto revelou tratar-se do derivado 6''- cinamato de polidatina (Figura 47).

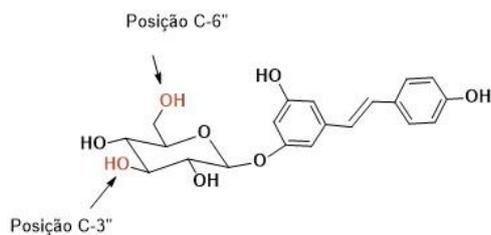


Figura 46. Posições com maior probabilidade de ocorrer acilações na polidatina.

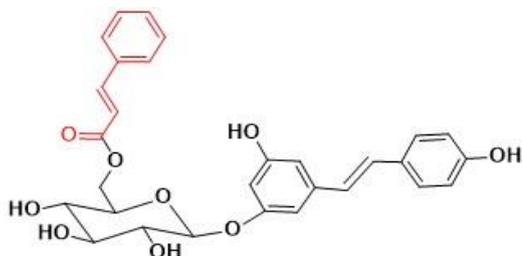


Figura 47. Estrutura do cinamato de polidatina.

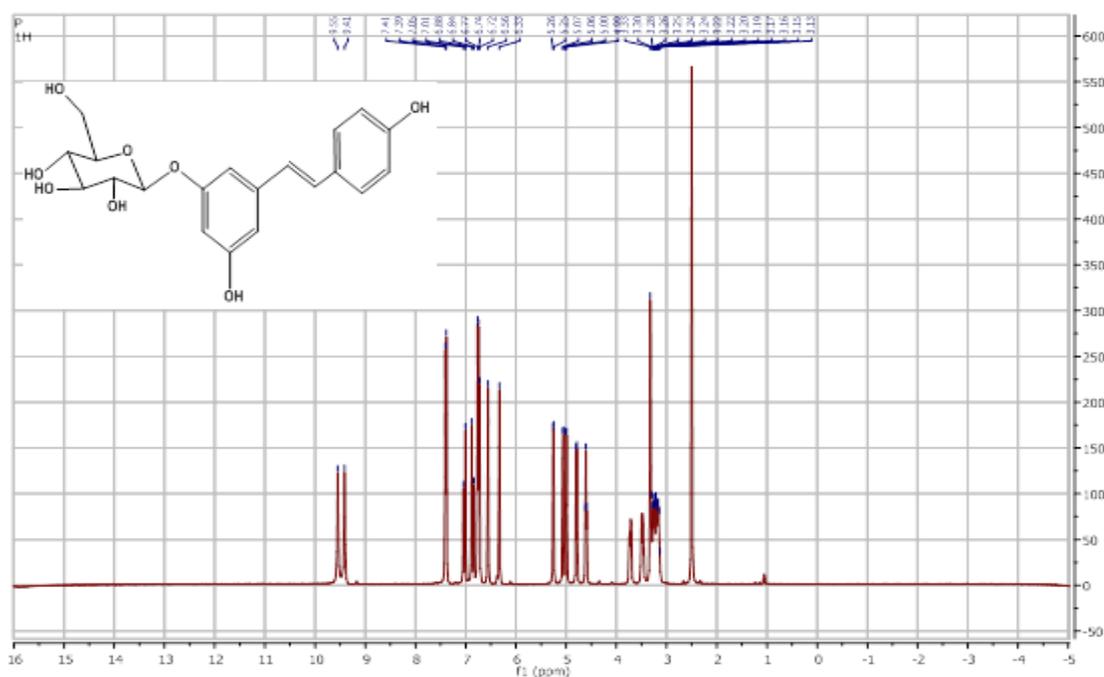


Figura 48. Espectro de RMN ^1H da polidatina.

O espectro RMN ^1H da polidatina (figura 48) indica a presença dos hidrogénios ligados a carbonos aromáticos: dois dubletos a δ_{H} 7,49 ppm (2H, d, $J=8$ Hz, H-2' e H-6') e δ_{H} 6,75 ppm (2H, d, $J=8$ Hz) e três singletos a δ_{H} 6,72 ppm, δ_{H} 6,56 ppm e δ_{H} 6,33 que correspondem aos hidrogénios H-2, H-6 e H-4, respectivamente. Verifica-se a presença dos sinais característicos dos hidrogénios ligados à olefina, que correspondem a dois dubletos a δ_{H} 7,03 (1H, d, $J=16$ Hz, H-b) e δ_{H} (1H, d, $J=16$ Hz, H-a). A presença dos

hidrogénios dos grupos OH foi detectada como dois singletos a δ_H 9,55 ppm atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo ligado ao carbono C-4' e δ_H 9,41 ppm atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo ligado ao carbono C-5, e três dubletos a δ_H 5,26 ppm, δ_H 5,06 ppm e δ_H 5,00 ppm. Por fim, notou-se a presença dos hidrogénios ligados aos carbonos da glucose que correspondem ao multipletto a δ_H 3,07-3,57 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6'').

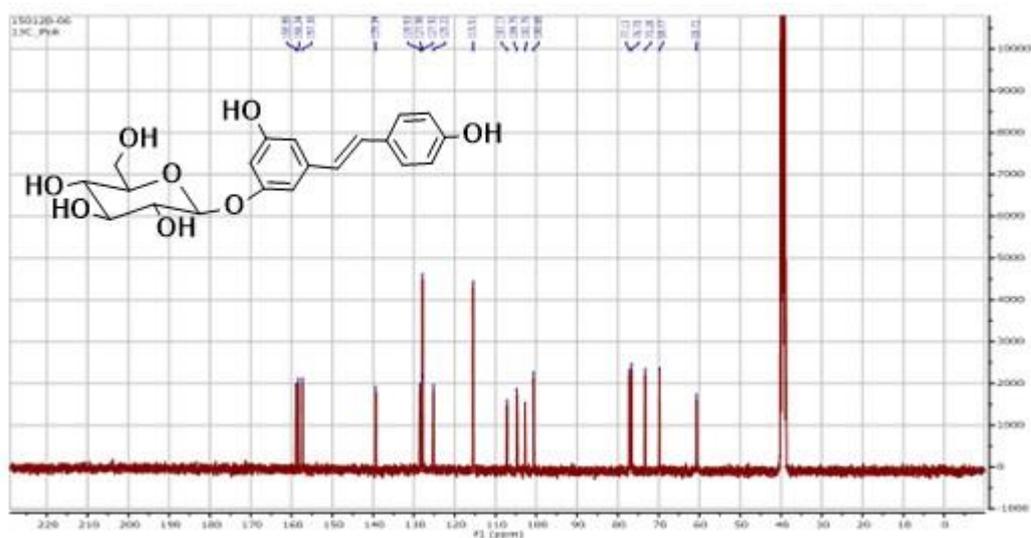


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C da polidatina

O espectro de RMN ^{13}C da polidatina (figura 49) forneceu os desvios dos 20 carbonos da estrutura da polidatina: 158,88 ppm (C-3); 158,34 ppm (C-5); 157,30 ppm (C-4'); 139,34 ppm (C-1); 128,53 (C-1'); 127,98 ppm (C- β); 127,92 ppm (C-2' e C-6'); 125,22 (C- α); 115,51 ppm (C-3' e C-5'); 107,17 ppm (C-6); 104,75 (C-4); 102,75 (C-2); 100,68 (C-1''); 77,13 (C-5''); 76,70 (C-3''); 73,28 (C-2''); 69,77 (C-4''); 60,72 (C-6'').

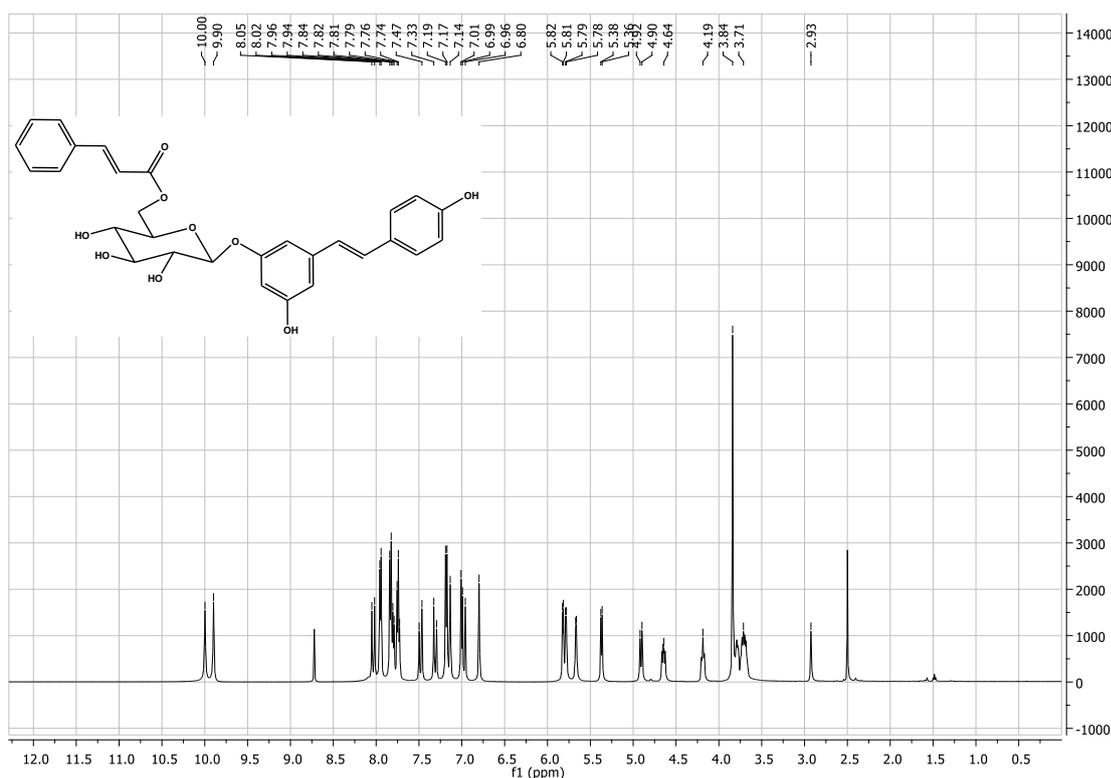


Figura 50. Espectro de RMN ¹H do cinamato de polidatina.

O espectro RMN ¹H do cinamato de polidatina (figura 50) indica a presença dos hidrogénios dos grupos OH fenólicos inalterados, tendo sido detectados como dois singletos a δ_H 10.0 e 9.90 ppm. A presença dos hidrogénios ligados a carbonos aromáticos: dois dubletos a δ_H 7,49 ppm (2H, d, J=8 Hz, H-2' e H-6') e δ_H 6,75 ppm (2H, d, J=8 Hz) e três singletos a δ_H 6,72 ppm, δ_H 6,56 ppm e δ_H 6,33 que correspondem aos hidrogénios H-2, H-6 e H-4, respectivamente e os multipletos correspondentes ao anel aromático do cinamato. A presença dos hidrogénios ligados aos carbonos da glucose que correspondem ao multipletos a δ_H 3,50-4.2.

O espectro de RMN ¹³C do cinamato de polidatina (figura 51) forneceu os desvios dos 29 carbonos da estrutura da polidatina, com destaque para o sinal a 166,25 ppm correspondente ao grupo carbonilo.

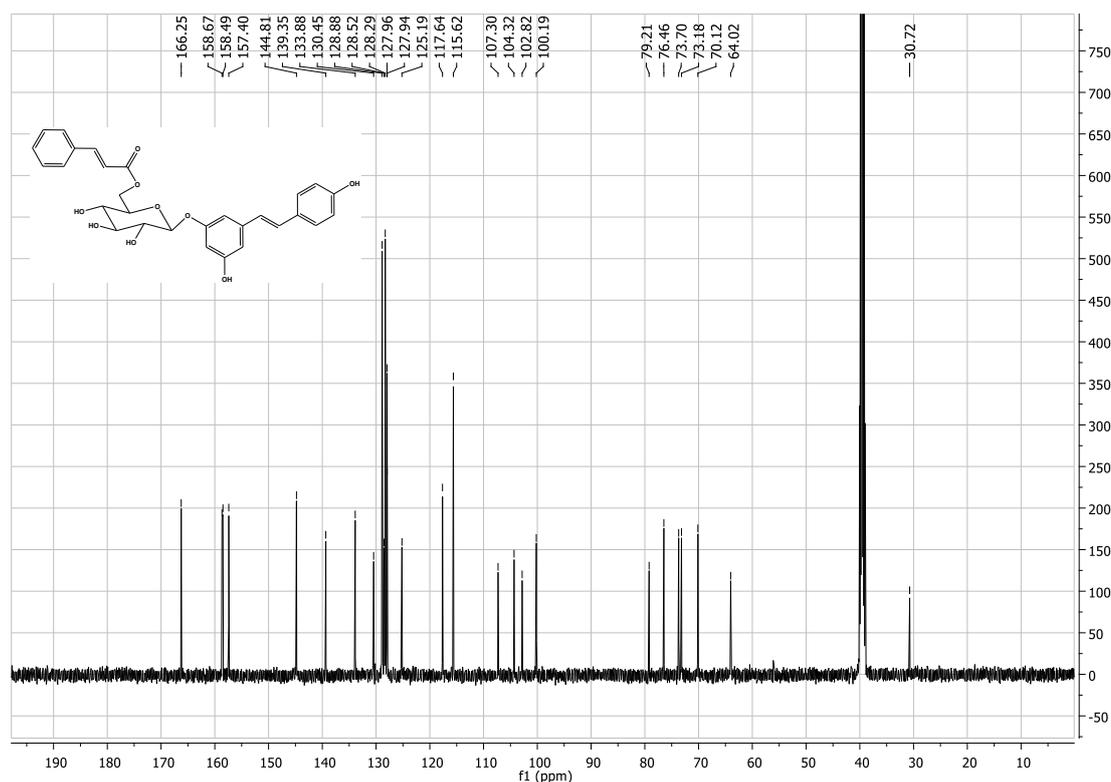


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C do cinamato de polidatina.

7. Testes de atividade anti-inflamatória dos derivados polifenólicos acilados

7.1. Solubilização dos polifenóis

Inicialmente os compostos foram testados usando DMSO como veículo, pois para além deste ser o solvente mais utilizado em ensaios biológicos *in vitro* (BALAKIN *et al.*, 2004, DI *et al.*, 2006, HOLLEBEECK *et al.*, 2011), é também muito usado em estudos *in vitro* com polifenóis (KIM *et al.*, 1999, WADSWORTH *et al.*, 1999).

Deste modo a rutina, polidatina e naringina foram dissolvidos em DMSO em concentrações entre 0,025% e 1% de solvente. No entanto, o dibutirato de polidatina não se dissolveu bem neste veículo, precipitando quando adicionado ao meio de cultura. Este derivado da polidatina é a molécula mais lipofílica do nosso conjunto de compostos teste visto que o logP da polidatina é o mais alto dentro dos polifenóis avaliados (polidatina LogP 3.5; rutina LogP - 1,3; naringina LogP -0,5) (PUBCHEM,

2016). Este fato é corroborado pelos dados relatados por BALAKIN *et al.* (2004), cujo trabalho demonstra que compostos com elevado logP (coeficiente de partição octanol/água) apresentam baixa solubilidade em DMSO.

Ao longo do processo de descoberta de fármacos tais problemas de solubilidade são muito comuns. As alterações estruturais que aumentam a lipofilicidade são muito vantajosas, pois geralmente tornam as moléculas mais bioativas. Em contrapartida, estas alterações podem reduzir a solubilidade das mesmas em meio aquoso (DI *et al.*, 2006).

Além do problema de solubilidade relatado para uma das moléculas testadas, o veículo interferiu na atividade dos compostos, reduzindo a produção de óxido nítrico e potenciando o efeito real dos polifenóis avaliados. Conforme relatado por HOLLEBEECK e colaboradores (2011), mesmo em concentrações baixas (0,1-0,5%), o DMSO apresenta propriedades anti-inflamatórias *in vitro*, reduzindo a secreção de citocinas, produção de PGE₂ relacionada com a atividade da COX-2 e ainda a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta inflamatória. Portanto, em concentrações superiores a 0,1%, o DMSO pode interferir com ensaios de atividade anti-inflamatória *in vitro*.

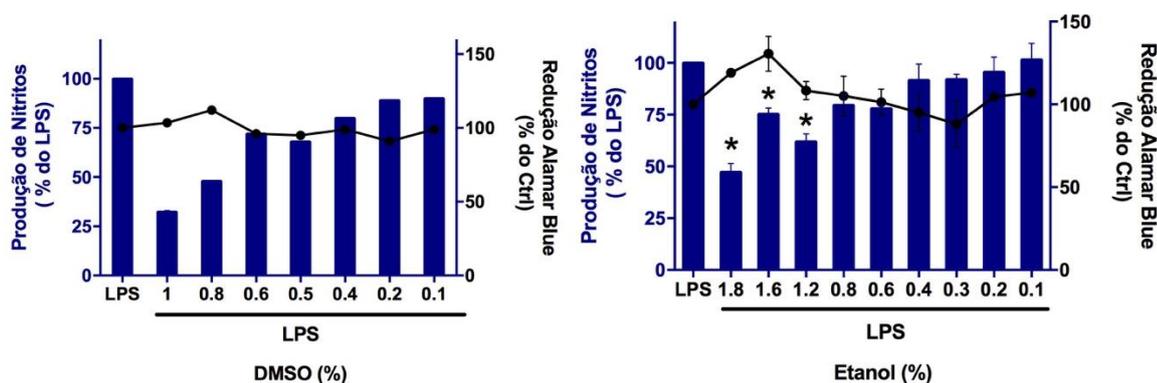


Figura 52. Interferência gerada pelos veículos DMSO (N=1) e etanol (N=3) na produção de nitritos e viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7. As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). Os símbolos (*) indicam a diferença estatística da produção de nitritos relativamente ao controlo positivo LPS (50 ng/mL), onde (*) $p < 0,05$.

Como alternativa, os compostos foram testados usando como veículos o etanol e meio de cultura; com estes veículos observou-se um aumento da solubilidade dos compostos e uma menor interferência nos resultados relativos à atividade anti-inflamatória. A influência dos veículos é apresentada na figura 52, onde se pode constatar que o DMSO apresenta maior interferência na atividade anti-inflamatória em concentrações similares ao etanol. Ambos os veículos não influenciaram significativamente a viabilidade celular.

CHAN e colaboradores (2000) avaliaram a atividade de polifenóis na produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7, usando o etanol (concentrações de 0,1 a 0,75%) como veículo. Este estudo demonstrou que, nestas concentrações, não ocorreram interferências significativas do etanol na produção de NO ou na expressão de iNOS. O trabalho de CHAN e colaboradores mostra ainda a obtenção de melhores resultados com o uso de etanol como veículo relativamente a outros solventes, o que também foi observado no presente trabalho. A polidatina, a naringina e seus derivados obtiveram melhores resultados usando o etanol como solvente, ao passo que a rutina e os derivados, por serem os compostos mais hidrossolúveis do conjunto de compostos teste, dissolveram-se facilmente no meio de cultura, não sendo necessário a utilização do solvente orgânico como veículo.

As quantidades de etanol usadas nas experiências variaram de 0,02% a 1,8%. Tal como referido previamente, o etanol foi o veículo de escolha por apresentar menor interferência na atividade estudada, além de solubilizar o dibutirato de polidatina. No entanto, devido às limitações na solubilidade, foi necessário utilizar concentrações de etanol que interferiam com a avaliação da atividade anti-inflamatória. A fim de minimizar ao máximo os problemas relacionados com essa questão optou-se por calcular a percentagem de produção de óxido nítrico para cada concentração testada considerando-se como controlo as células estimuladas com LPS e a respectiva concentração de etanol. Para o cálculo da percentagem de produção de NO pelas moléculas testados, foi usada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de produção de NO} = \frac{\% \text{ da produção de NO de células com LPS e composto teste}}{\% \text{ da produção de NO de células com LPS e etanol}} \times 100$$

7.2. Avaliação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico endógeno pode ser sintetizado por 3 isoformas enzimáticas: (1) nNOS (neuronal), (2) eNOS (endotelial), (3) iNOS (induzida), que atua, respectivamente, como (1) mediador biológico similar a neurotransmissores, (2) na regulação do tónus vascular e como (3) efectores de defesa do sistema imunológico (AKTAN, 2004). Apenas as duas primeiras isoformas são constitutivas sendo a sua ativação regulada por fluxos de cálcio. A iNOS é induzida e a sua transcrição é regulada por citocinas inflamatórias ou produtos microbianos originários de infeções (BOGDAN, 2001).

Os macrófagos e outras células imunes ativadas por citocinas, produtos microbianos ou ambos, induzem a transcrição da enzima indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS) e conseqüentemente a produção de óxido nítrico. O NO surge da transformação enzimática do aminoácido L-arginina em L-citrulina (BOGDAN, 2001) (Figura 53).

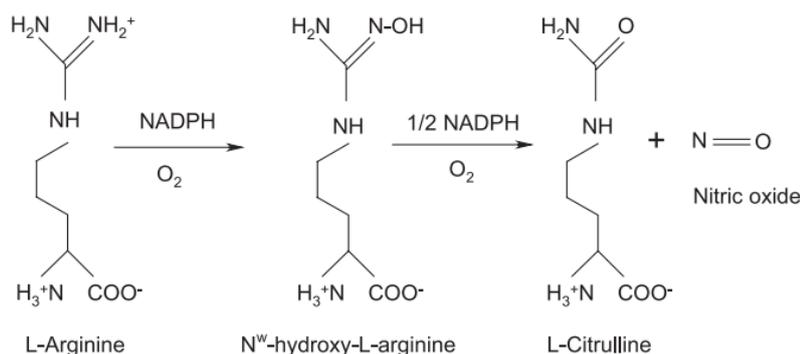


Figura 53. Biossíntese de NO a partir de L-arginina, catalisada pela iNOS. O NO endógeno é sintetizado pela conversão de L-arginina a L-citrulina. Durante esta reação, o NADPH é usado como um doador de electrões e a NOH-arginina é gerada como um intermediário. Fonte: AKTAN (2004).

O óxido nítrico produzido pelas células do sistema imunológico atua como agente anti-microbiano e anti-tumoral, pois tem alta afinidade para proteínas que

contêm o grupo heme, nomeadamente enzimas relacionadas com o transporte de electrões na mitocôndria, replicação do DNA e do ciclo do ácido cítrico. Além disso, o NO interfere diretamente com o DNA de células alvo, causando fragmentação e quebras do mesmo (FÖRSTERMANN *et al.*, 2012).

No hospedeiro, e em situações de inflamação crónica e doenças autoimunes, a acção inespecífica do NO acaba por danificar os tecidos, além de atuar na rejeição de aloenxertos (FÖRSTERMANN *et al.*, 2012). Desta forma, a inibição da produção de óxido nítrico pode ser considerada como um alvo terapêutico, visto que a sua modulação tende a reduzir a resposta inflamatória (HOBBS *et al.*, 1999).

Em células ativadas por LPS, a indução da iNOS ocorre principalmente pela via do NF-kB (GUZIK *et al.*, 2003). Neste sentido, os compostos que alteram a produção de óxido nítrico podem atuar: (1) de forma directa por captação de moléculas de NO; (2) inibindo diretamente a iNOS; (3) inibindo algum ponto da via do NF-kB responsável pela expressão da iNOS. Na literatura são numerosos os trabalhos que investigam a influência de polifenóis na produção de NO e na via do factor de transcrição NF-kB (GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009, KANNO *et al.*, 2006, RIBEIRO *et al.*, 2015).

Seguindo a linha de pensamento apresentada nos parágrafos anteriores, este trabalho procurou investigar o efeito de novos derivados de polifenóis na produção de óxido nítrico, induzida por LPS, em macrófagos RAW. Dessa forma, esta investigação permitiu identificar a atividade anti-inflamatória das moléculas testadas e elucidar, parcialmente, os mecanismos moleculares subjacentes.

As estruturas e pesos moleculares dos compostos avaliados encontram-se na tabela 12. A concentração de nitritos acumulados no meio de cultura foi quantificada pela reação de Griess, fornecendo uma medida indirecta da produção de NO por parte das células. Após 24 horas de incubação sem LPS, os macrófagos produziram cerca de 0,6 μ M de óxido nítrico. Quando os polifenóis foram adicionados aos macrófagos, na ausência de LPS, não se observou alteração do valor basal de nitritos no meio de cultura, mantendo-se o mesmo perfil de produção de NO relativamente às células não estimuladas. Depois de tratados com LPS (50 ng/mL) por 24 horas, os

macrófagos produziram cerca de 20µM a 30µM de NO, ocasionando um aumento na produção de NO de cerca de 33 a 50 vezes relativamente às células não estimuladas.

Tabela 12. Rutina, naringina, polidatina e derivados acilados. As partes assinaladas a vermelho foram introduzidas por semi-síntese em catálise enzimática.

Sigla	Estrutura	PM g/mol
Naringina		580,5
6''- acetato de naringina		622,5
4'''- 6''-diacetato de naringina		664,5
6''- butirato de naringina		650,5
Polidatina		390,4
6''- cinamato de polidatina		521

3''-6''- Dibutirato de polidatina		530,5
Rutina		610,5
3''-4'''- Diacetato de rutina		694,5
3''-4'''- Dipropianato de rutina		722,5

7.2.1. Rutina e Derivados

Os compostos rutina, 3''- 4'''-diacetato de rutina e 3''- 4'''- dipropianato de rutina foram dissolvidos em meio de cultura, em concentrações entre 25 μ M e 300 μ M. As suas estruturas e pesos moleculares encontram-se representadas na tabela 12.

A citotoxicidade da rutina, 3''- 4'''- diacetato de rutina e 3''- 4'''- dipropionato de rutina foi avaliada usando a resazurina (*Alamar blue*). Os resultados demonstram que os compostos não reduzem a viabilidade das células RAW 264.7 nas concentrações testadas (Figura 54), pelo que a inibição da produção de nitritos pela rutina e derivados não resulta de citotoxicidade sobre os macrófagos.

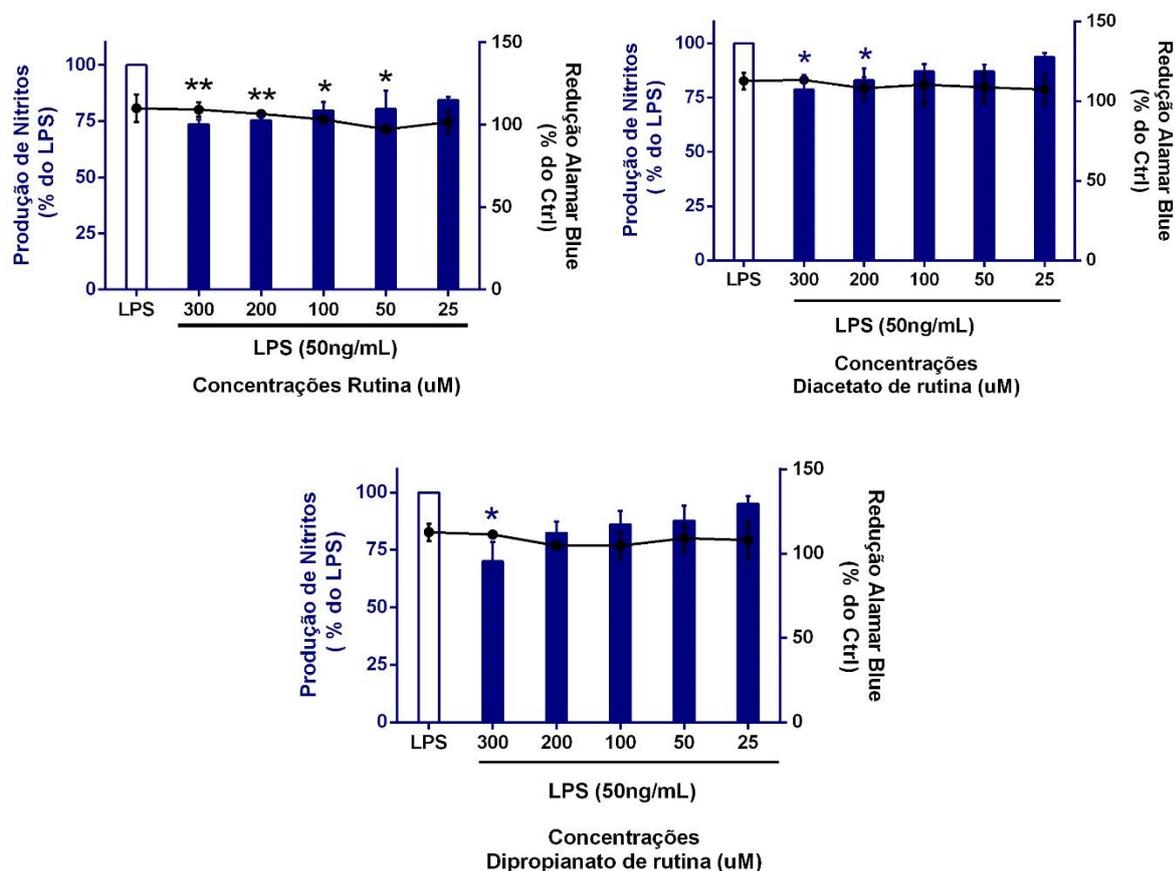


Figura 54. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), rutina e derivados. As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). Os símbolos (*) e (**) indicam a diferença estatística da produção de nitritos relativamente ao controlo positivo LPS 50 ng/mL, onde (*) = $P < 0,05$ e (**) = $P < 0,01$. A percentagem da produção de nitritos foi calculada relativamente à concentração do controlo positivo LPS 50 ng/mL.

A atividade sobre a produção de NO, apresentada pelos derivados 3''- 4'''- diacetato de rutina e 3''- 4'''- dipropionato de rutina, não difere estatisticamente da atividade demonstrada pela rutina (Figura 55). Estes resultados permitem concluir que as acilações não modificaram a atividade da rutina relativamente à produção de NO por células RAW, nem alteraram a sua citotoxicidade, apesar do considerável aumento na lipofilicidade destes compostos.

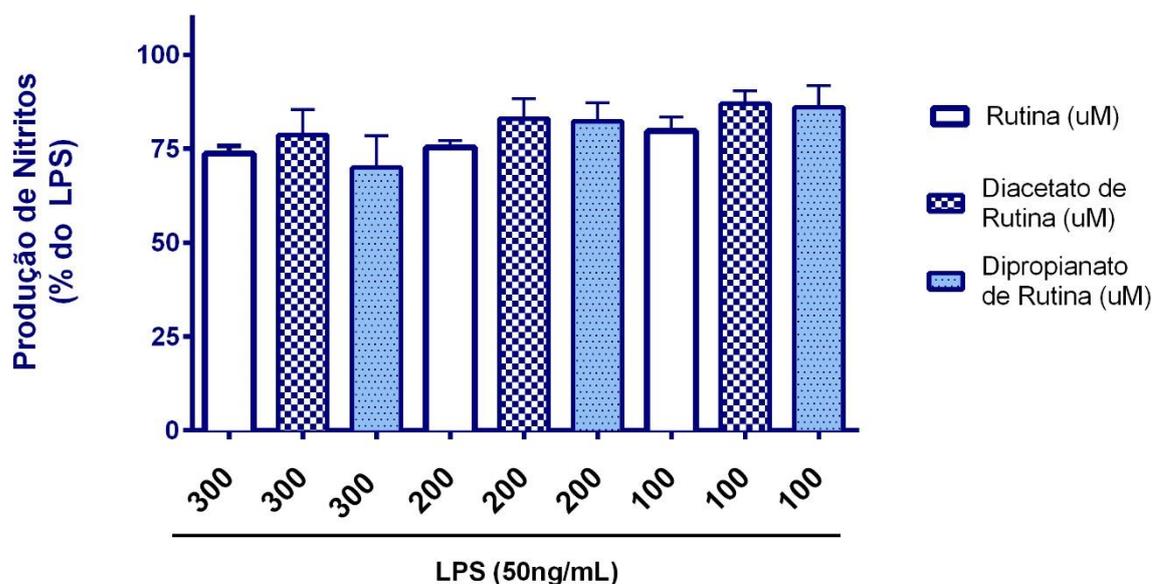


Figura 55. Comparação entre os efeitos da rutina e seus derivados na produção de nitritos em células RAW na presença de LPS (50 ng/mL). As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente à concentração do grupo controlo positivo LPS 50 ng/mL.

Na literatura existem publicações controversas relativamente à atividade da rutina na inibição da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. Alguns autores apresentam resultados que mostram inibições significativas por parte deste flavonol, ao passo que outros não observam atividade considerável (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados encontrados na literatura relativamente à atividade da rutina na produção de NO por macrófagos estimulados com LPS.

Artigo	Ativo	[] Rutina	% de inibição	Citotoxicidade	Células	Veículo
(LEE <i>et al.</i> , 2015)	Sim	30 μ M	66,7	A partir de 100 μ M	RAW 264.7	-
(GURUVAYOORAPPAN <i>et al.</i> , 2007)	Sim	40 μ M	85,6	Não	Macrófagos peritoneais de ratinhos	DMSO
(LYU <i>et al.</i> , 2005)	Não	100 μ M	-	Não	RAW 264.7	DMSO
(SHEN <i>et al.</i> , 2002)	Não	80 μ M	-	Não	RAW 264.7	-
(CHEN <i>et al.</i> , 2001)	Sim	40 μ M	48,2	Não	RAW 264.7	DMSO

Essas variações na atividade da rutina apresentadas na literatura podem estar relacionadas com as diferentes condições experimentais usadas, como por exemplo, concentração de LPS, número de células por condição de estudo e solvente utilizado. Os artigos citados não consideram a interferência do veículo, nem citam a concentração em que o mesmo foi usado. De enfatizar que dois artigos não citam nem o tipo, nem a concentração do veículo. No nosso estudo a rutina foi dissolvida apenas em meio de cultura, pelo que se exclui qualquer interferência do veículo no ensaio da atividade anti-inflamatória.

Como pode ser observado na figura 54, nenhum dos resultados apresentados na literatura corroboram com aqueles obtidos neste trabalho. No nosso estudo, a rutina inibiu significativamente a produção de NO quando utilizada em concentrações iguais ou superiores a 50 μM , sendo as percentagens de inibição de 26 % ($p < 0,01$; SEM: 2,028) para 300 μM e de 20% ($p < 0,05$; SEM: 8,172) para 50 μM .

7.2.2. Polidatina e Derivados

A polidatina, 3''- 6''- dibutirato de polidatina e o 6''- cinamato de polidatina foram dissolvidos em etanol. As suas estruturas encontram-se explanadas na tabela 12.

Quando os macrófagos RAW foram tratados durante 24 horas com diferentes concentrações de polidatina, na presença do LPS, ocorreu redução na produção de óxido nítrico. Para a concentração de 300 μM , a produção de NO foi reduzida em 56% ($p < 0,0001$; SEM : 2,651), sendo a inibição dependente da dose (Figura 56).

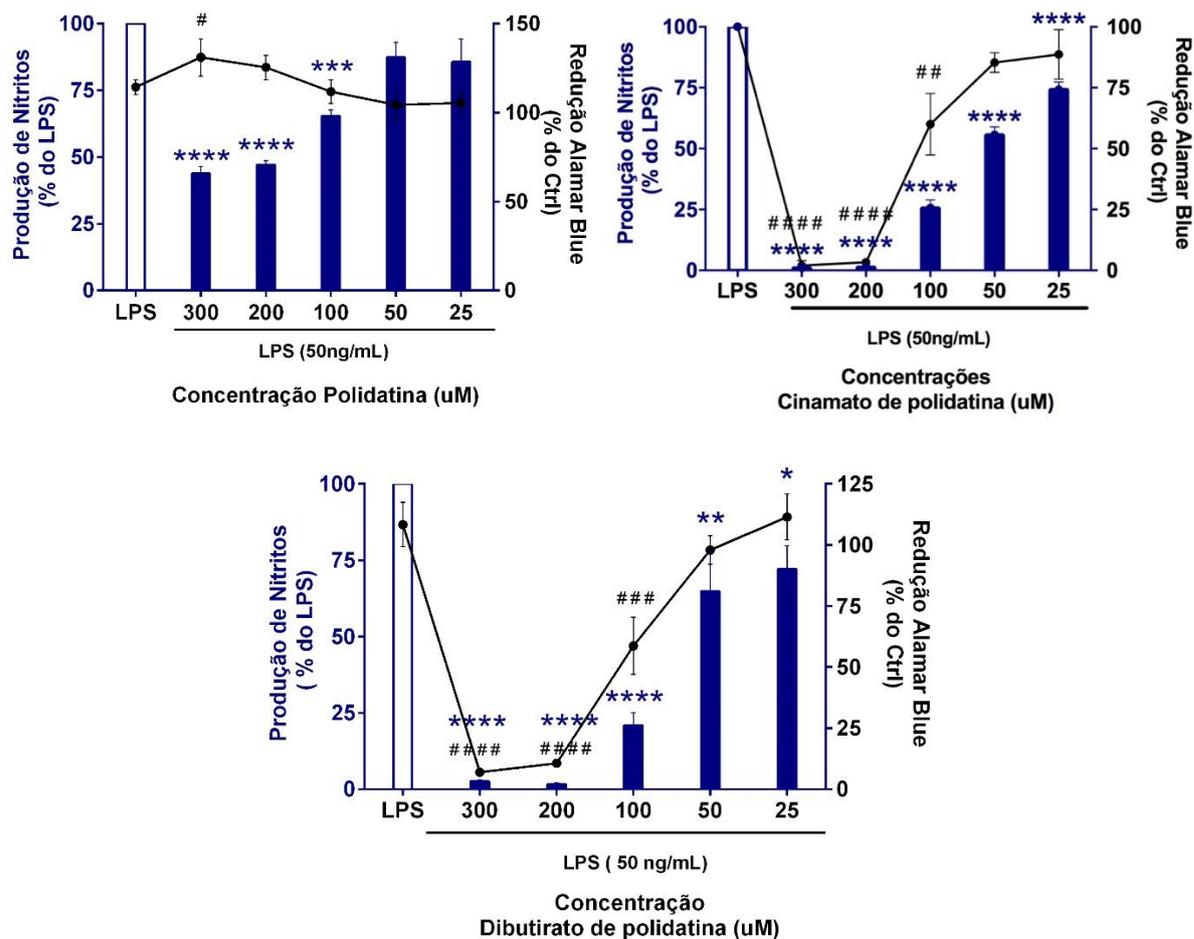


Figura 56. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), polidatina e derivados. As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). Os símbolos (*), (**), (***), (****) indicam a diferença estatística da produção de nitrito relativamente ao controlo positivo LPS 50 ng/mL. Os símbolos (#), (##), (###), (####) indicam a diferença estatística da citotoxicidade relativamente ao controlo apenas com células. Onde (*) e (#) $p < 0,05$; (##) e (**) $p < 0,01$; (***), (###) $p < 0,001$; (####), (****) $p < 0,0001$. A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente à concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) por 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.**

As alterações estruturais realizadas nos compostos, e consequentemente as mudanças nas suas propriedades físico-químicas, tornaram o dibutirato e o cinamato de polidatina citotóxicos. Para o dibutirato de polidatina ocorreu uma inibição da redução da resazurina de 93% ($p < 0,0001$; SEM: 1, 528) e 89,5% ($p < 0,0001$; SEM : 0,882) para as concentrações de 300 μ M e 200 μ M, respectivamente; para o cinamato de polidatina verificou-se uma inibição da redução da resazurina de 98% ($p < 0,0001$; SEM: 2,082) e 96.7% ($p < 0,0001$; SEM: 1,202) para as concentrações de 300 μ M e 200 μ M, respectivamente. Contrariamente, a polidatina não apresentou citotoxicidade nas

mesmas concentrações (Figura 56). Ambos os compostos deixaram de exercer citotoxicidade significativa para concentrações iguais ou inferiores a 50µM (Figura 55).

Na figura 57 pode-se observar a comparação entre a produção de óxido nítrico pela polidatina e seus derivados em concentrações não citotóxicas, nota-se que a modificação estrutural não alterou significativamente a atividade anti-inflamatória dos compostos.

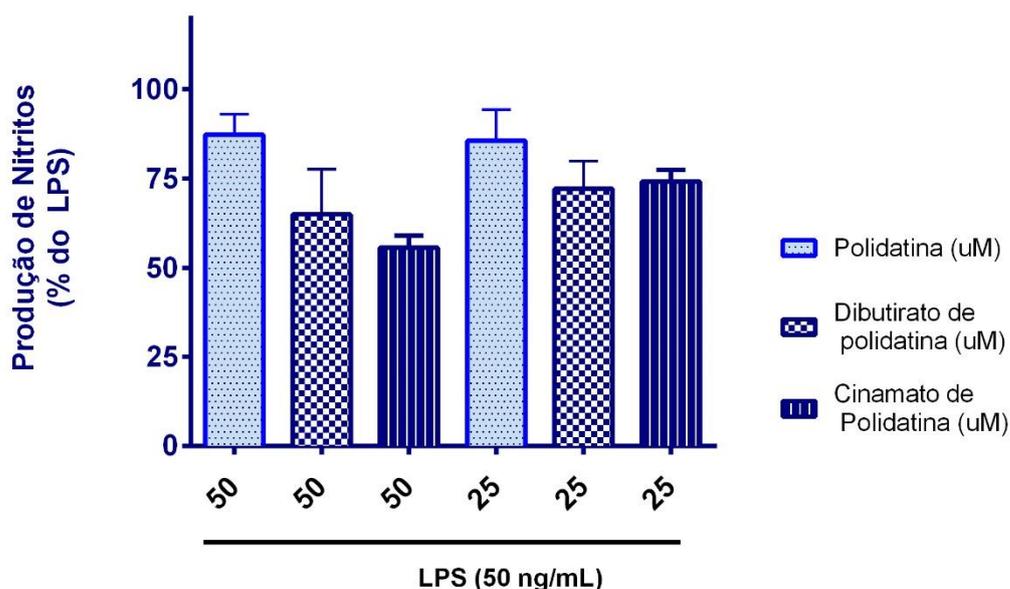


Figura 57. Comparação entre os efeitos da polidatina e seus derivados na produção de nitritos em células RAW 264.7 ativadas por LPS (50 ng/mL). As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente a concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) por 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.**

A atividade citotóxica dos estilbenos está amplamente relatada na literatura (ADIABOUAH ACHY-BROU *et al.*, 2016, BILLACK *et al.*, 2008, JAKUBOWSKA *et al.*, 2014, TOLOMEO *et al.*, 2005). Esta atividade tem sido frequentemente demonstrada em células tumorais (JAKUBOWSKA *et al.*, 2014, MURIAS *et al.*, 2005, SU *et al.*, 2013, HADI *et al.*, 2007, TOLOMEO *et al.*, 2005).

RADKAR *et al.* (2008) relata que o resveratrol, em concentrações citotóxicas, afeta a integridade do DNA de macrófagos RAW 264.7, levando à apoptose. Esta fragmentação do DNA tem sido relacionada com a oxidação mediada por iões de

cobre II endógenos (AZMI *et al.*, 2006, HADI *et al.*, 2007, ZHENG *et al.*, 2006). Outros estudos verificaram morte celular por interrupção do ciclo celular (EMPL *et al.*, 2015, SU *et al.*, 2013).

Um trabalho desenvolvido por SU *et al.* (2013), compara o efeito citotóxico da polidatina e do resveratrol em linhas celulares tumorais e conclui que a aglicona é mais citotóxica que o derivado glicosídico. Este estudo demonstra ainda que o principal mecanismo de morte dos macrófagos consiste na interrupção do ciclo celular, sendo a apoptose pouco expressiva. A fim de investigar os mecanismos responsáveis pela toxicidade superior do resveratrol relativamente à polidatina, avaliou-se a captação desses dois compostos pelas células testadas, e observou-se que o resveratrol é mais bem absorvido pelas células (SU *et al.*, 2013). Este estudo demonstra que um fator limitante da citotoxicidade dos estilbenos é a absorção dos mesmos pelas células, logo, tomando como exemplo o presente estudo, o aumento da lipofilia propiciado pela acetilação de grupos hidroxilos da polidatina, pode ter contribuído para uma melhor absorção celular, induzindo o aumento da citotoxicidade.

7.2.3. Naringina e derivados

Os compostos naringina, 6''- acetato de naringina, 4'''- 6''-diacetato de naringina e 6''- butirato de naringina foram dissolvidos em etanol. As suas estruturas e pesos moleculares encontram-se expostos na tabela 12.

Quando os macrófagos RAW foram tratados com naringina na presença do LPS, durante 24 horas, verificou-se que apenas a concentração de 400 µM inibiu significativamente a produção de óxido nítrico (38%; $p < 0,01$; SEM : 9,918) (Figura 58).

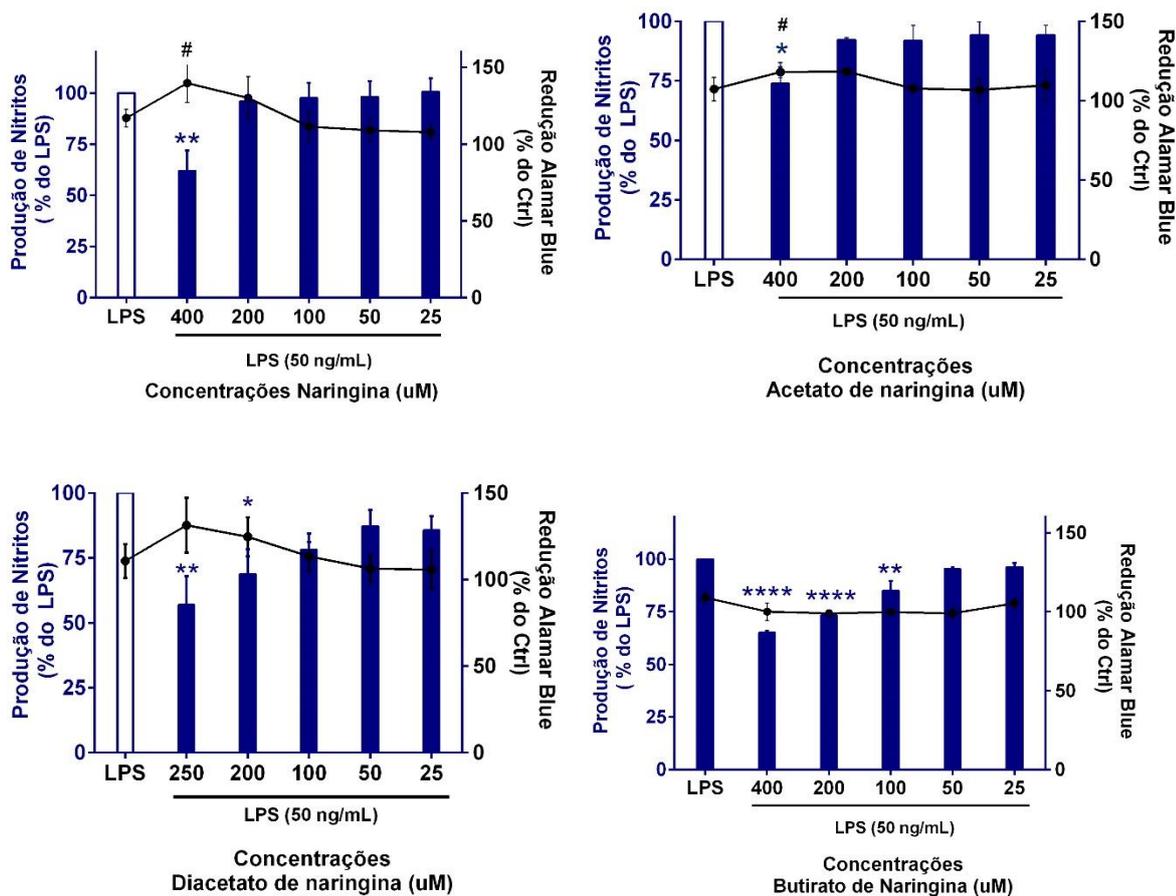


Figura 58. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL), naringina e derivados. As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). Os símbolos (*), (**) e (****) indicam a diferença estatística da produção de nitrito relativamente ao controlo positivo LPS 50 ng/mL. O símbolo (#) indica a diferença estatística entre a citotoxicidade e o controlo contendo apenas células. Onde (*) e (#) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, (****), $p < 0,0001$. As percentagens da produção de nitrito foram calculadas relativamente à concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) durante 24 horas, usando a seguinte fórmula: **% de NO = % de NO (LPS + composto teste) / % de NO (LPS + etanol) X 100.**

A citotoxicidade dos compostos naringina, 4''- 6''-diacetato de naringina, 6''-butirato de naringina e 6''- acetato de naringina foi avaliada usando a resazurina (*Alamar blue*), tendo os resultados demonstrado que os compostos não alteram a viabilidade dos macrófagos nas concentrações testadas (Figura 58). Pelo exposto, pode-se concluir que a inibição da produção de NO induzida pela naringina e derivados, em macrófagos estimulados com LPS, não resulta de citotoxicidade sobre as células.

Para a concentração de 250µM do diacetato de naringina, observa-se uma redução de 43% ($P < 0,01$; SEM: 11,035) na produção de NO pelos macrófagos RAW. O derivado diacetato não foi testado na concentração de 400 µM devido a questões de solubilidade, sendo então comparado com os outros derivados apenas em concentrações inferiores a 200µM. Como pode ser observado na figura 59, os compostos diacetato de naringina e butirato de naringina à 200 µM mostram-se significativamente mais potentes que a naringina, apresentando inibições na produção de NO de 31% ($p < 0,05$; SEM: 9,454) e 27% ($p < 0,05$; SEM: 0,881), respectivamente. Os resultados permitem concluir que essas acilações tornaram a naringina mais potente relativamente à inibição da produção de óxido nítrico, não afetando a toxicidade celular.

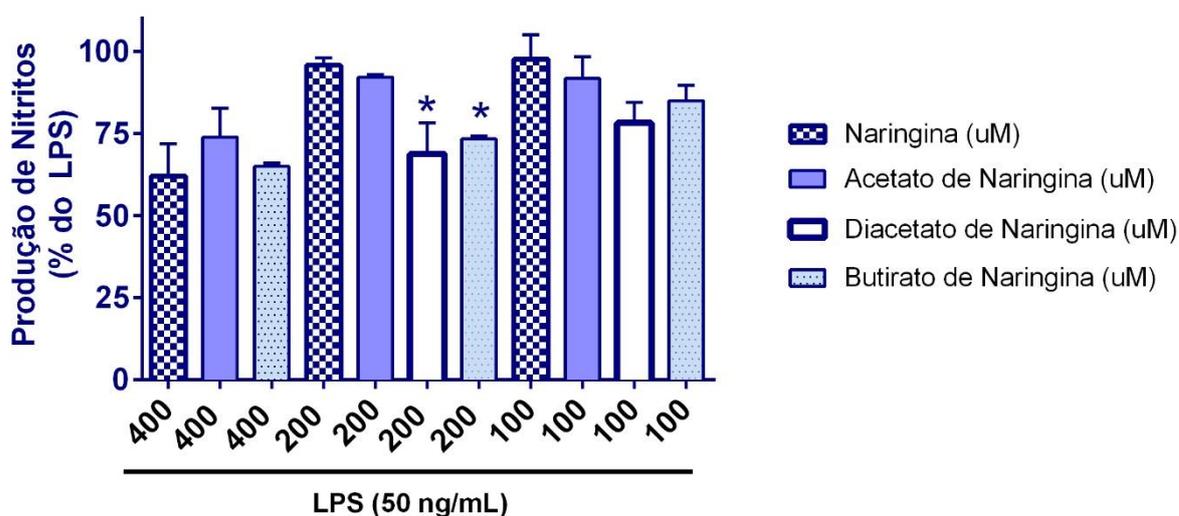


Figura 59. Produção de óxido nítrico e citotoxicidade em macrófagos RAW na presença de LPS (50 ng/mL). As barras e pontos dos gráficos representam a média \pm SEM (N= 3). O símbolo (*) indica a diferença estatística entre a atividade dos derivados relativamente à naringina, onde (*) $p < 0,05$. A percentagem da produção de nitrito foi calculada relativamente à concentração do grupo controlo com veículo e LPS (50 ng/mL) durante 24 horas, usando a seguinte fórmula: $\% \text{ de NO} = \% \text{ de NO (LPS + composto teste)} / \% \text{ de NO (LPS + etanol)} \times 100$.

Um estudo realizado recentemente por HATTORI e colaboradores (2016) avaliou a atividade de derivados acil ésteres da naringina ligados na posição C-6" do glicosídeo. Foram testados derivados ésteres entre 2 e 18 carbonos, sendo que os derivados com mais de 12 carbonos mostraram citotoxicidade. Observou-se ainda que o crescimento progressivo da cadeia carbónica está directamente relacionado

com um aumento na capacidade de inibição da produção de NO, sendo que o derivado C-12 apresentou o melhor resultado.

Dentro do grupo de compostos testados por HATTORI *et al.* (2016) referem-se o acetato e o butirato de naringina, que também foram alvo de estudo no presente trabalho. Para a concentração de 50 μ M, ambos os compostos apresentaram resultados semelhantes aos obtidos por HATTORI e colaboradores.

Ainda de acordo com este estudo, avaliou-se a captação do derivado C-12 pelos macrófagos RAW, tendo os resultados revelado que este composto foi parcialmente degradado na membrana celular e a naringina foi translocada para o citosol, o que indica que a naringina libertada a partir do derivado éster C-12 exerce efeito anti-inflamatório na supressão da via do NF-kB. Este fato permite-nos inferir que o aumento da lipofilicidade gerado pela adição de cadeias alquílicas a grupos hidroxilos livres da naringina, promove o aumento da absorção da mesma e consequentemente aumenta a sua atividade inibidora da produção de NO.

7.3. Avaliação da atividade antioxidante dos derivados de polifenóis relativamente ao “doador de NO” S-nitroso-n-acetil-DL-Penicilamina (SNAP).

Com o objetivo de avaliar se a redução da concentração de nitritos observada para os polifenóis estudados decorre da captação direta de óxido nítrico (atividade *scavenger*), foi feito um ensaio usando o composto S-nitroso-n-acetil-DL-Penicilamina (SNAP). Em solução, o SNAP liberta óxido nítrico, sendo que a sua estabilidade varia em função da temperatura, pH, pressão de oxigénio, nucleófilos, espécies com atividade redox e solução de incubação contendo concentrações vestigiais de metal. A meia vida do S-nitroso-n-acetil DL-Penicilamina pode variar de segundos a horas a pH 7,4, dependendo da natureza do tampão fisiológico (FEELISCH, 1998).

Todos os compostos em estudo foram avaliados relativamente à atividade *scavenger* de NO em concentrações variadas (Figuras 60, 61 e 62). O etanol foi usado como veículo para a naringina, polidatina e seus respectivos derivados. O veículo não mostrou influência significativa no ensaio.

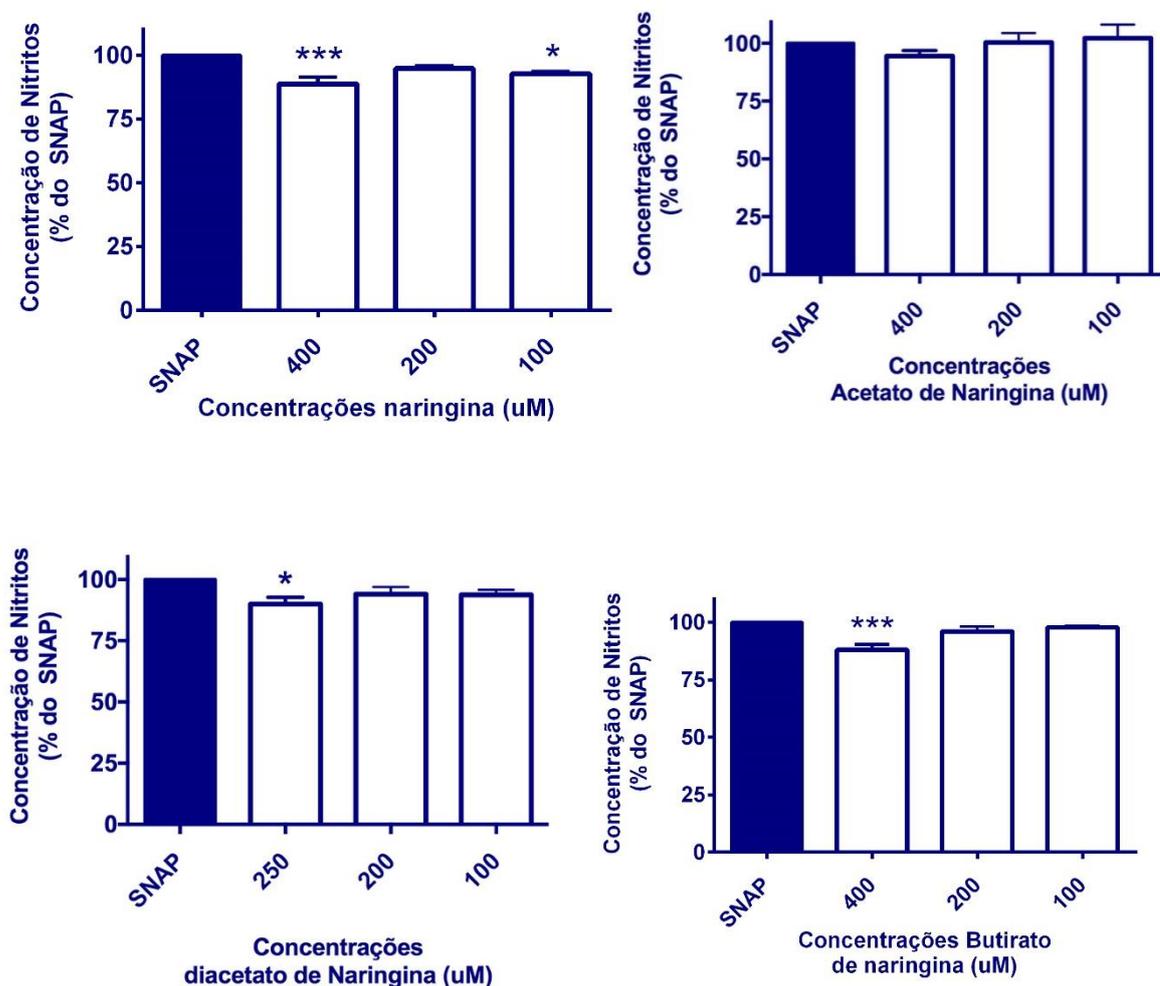


Figura 60. Atividade de “captação de NO” da naringina e derivados. Ensaio com SNAP como doador de óxido nítrico. Os dados apresentados representam a média \pm SEM (N = 3) e foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelo SNAP. Onde (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$.

O efeito *scavenger* de NO para a naringina e derivados se mostrou pouco expressivo, sendo estatisticamente relevante para a naringina a 400 μM e 100 μM, com atividade de 11% ($p < 0,001$; SEM: 2,75) e 7% ($p < 0,05$; SEM: 1,109), respectivamente; para o diacetato de naringina a 250 μM, com atividade de 10% ($p < 0,05$; SEM: 2,739); e para o butirato de naringina a 400 μM com atividade de 12% ($p < 0,001$; SEM: 2,415) (Figura 60). Importa ressaltar que a naringina (400 μM) reduziu a concentração de nitritos produzidos por macrófagos estimulados com LPS em 38%

($p < 0,01$; SEM: 9,918), o diacetato de naringina (250 μM) em 43% ($p < 0,01$; SEM: 11,035) e o butirato de Naringina (400 μM) em 35% ($p < 0,001$; SEM: 1,5) (Figura 58).

O efeito *scavenger* da polidatina e derivados também se mostrou pouco expressivo. A polidatina apresentou uma pequena atividade anti-oxidante, mostrando cerca de 15% de atividade a 300 μM ($p < 0,01$; SEM: 1,958) e 10% a 200 μM ($p < 0,05$; SEM: 4,498) (Figura 61). Nas mesmas concentrações e nos ensaios utilizando macrófagos, a polidatina mostrou uma inibição na produção de NO de 56% ($p < 0,0001$; SEM: 2,651) para a concentração de 300 μM e de 53% ($p < 0,0001$; SEM: 1,551) para 200 μM (Figura 56).

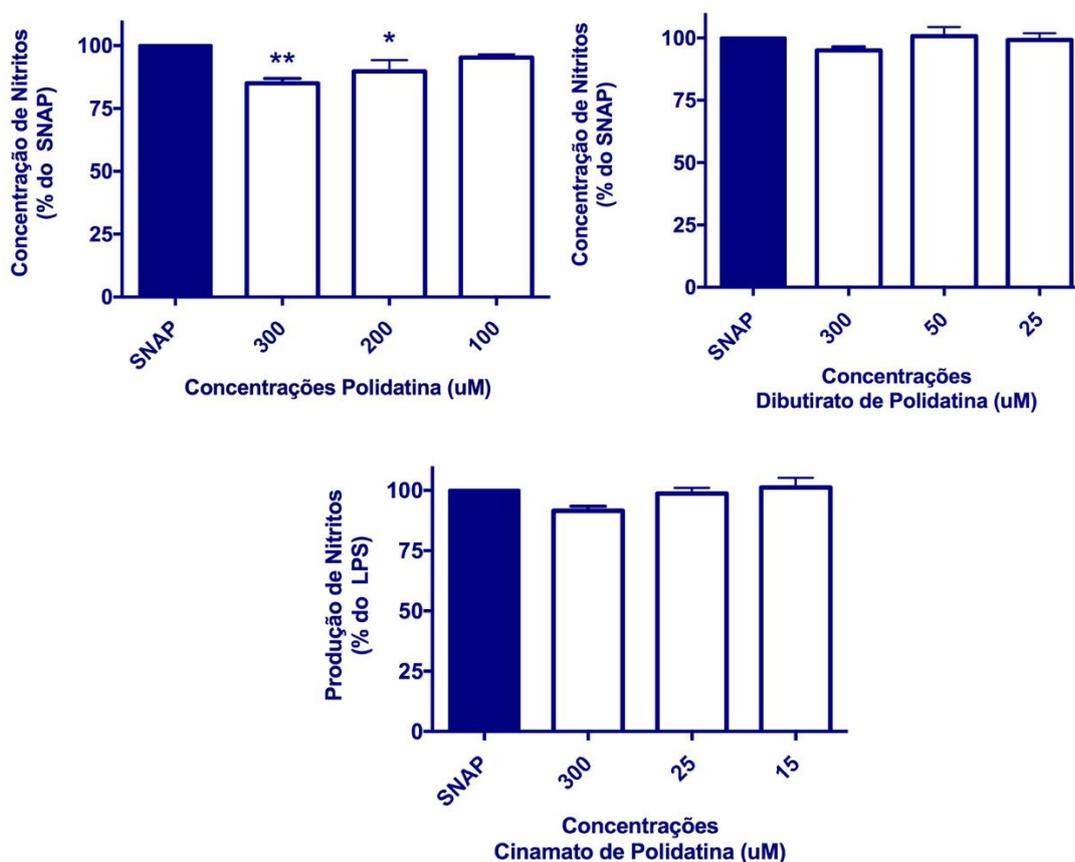


Figura 61. Atividade de "captação de NO" da polidatina e derivados. Ensaio com SNAP como doador de óxido nítrico. Os dados apresentados representam a média \pm SEM (N = 3) e foram expressos em percentagem de produção de nitritos pelo SNAP. Onde (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$.

Os resultados apresentados para a naringina, polidatina e derivados permitem concluir que a atividade apresentada por esses compostos está principalmente relacionada com uma inibição da produção de NO pelos macrófagos, sendo a atividade *scavenger* de NO pouco relevante.

Para a rutina e derivados o ensaio com o SNAP revelou que essas moléculas detêm considerável atividade antioxidante para o radical NO. Os compostos apresentaram atividade entre 30% a 20%, de uma forma praticamente independente da dose. Pode-se também observar na figura 62 que as modificações estruturais não alteraram, consideravelmente, a atividade antioxidante dessas moléculas.

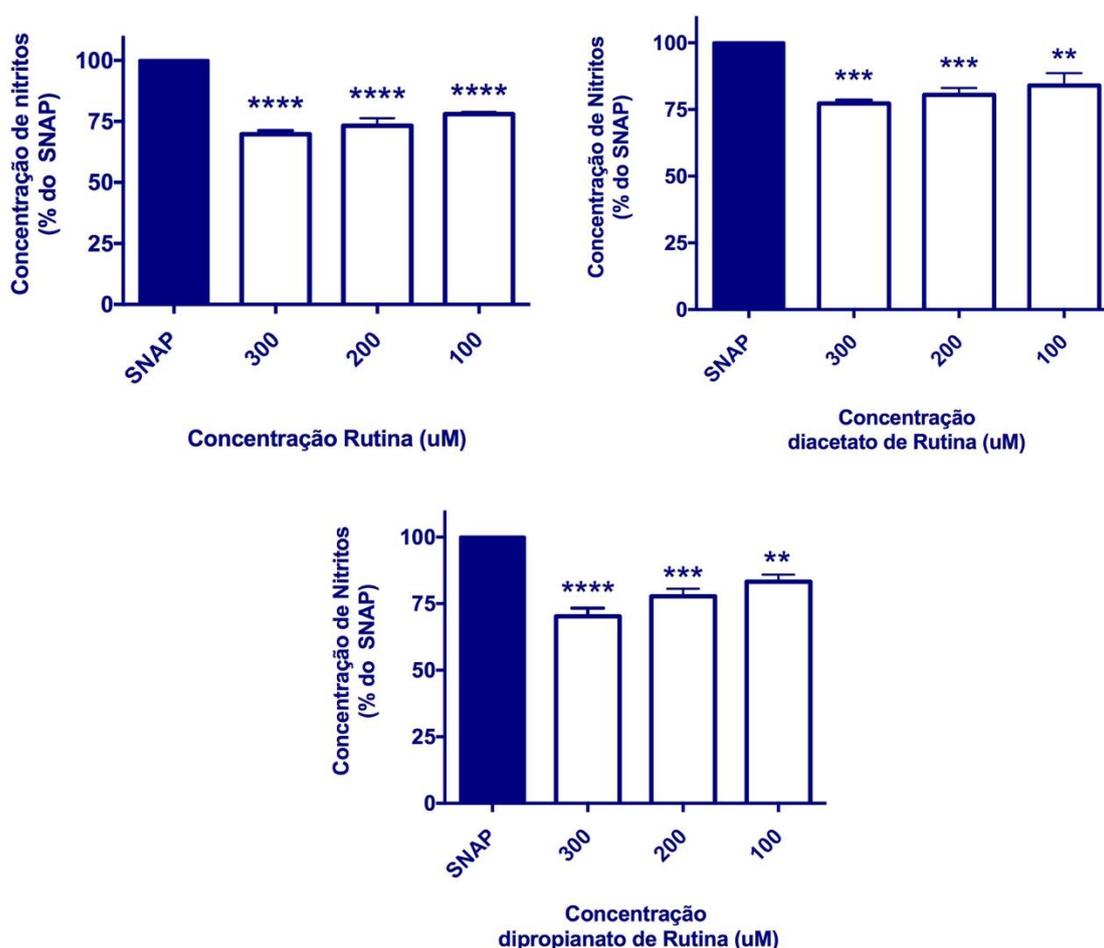


Figura 62. Atividade de “captação de NO” da rutina e derivados. Ensaio com SNAP como doador de óxido nítrico. Os dados apresentados representam a média \pm SEM (N=3). Onde (***) $p < 0,01$, (****) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Para a rutina e derivados, ao comparar os resultados obtidos nas experiências com o S-nitroso-n-acetil-DL-Penicilamina com os obtidos usando os macrófagos, é notável a semelhança entre a percentagem de redução da concentração de óxido nítrico nos dois ensaios. Nas experiências realizadas com macrófagos, as moléculas também reduziram entre 30% a 20% a produção de NO, com pouca ou nenhuma variação dependente da dose, além de não apresentarem mudanças na atividade com as alterações estruturais (Figura 55).

Estes resultados corroboram os da literatura, uma vez que a rutina tem reconhecida atividade *scavenger* para o óxido nítrico e tem sido utilizada como controlo positivo em testes de captação de NO que usam o SNAP como agente doador de NO. A rutina é usada como controlo positivo a 1 mM, concentração na qual reduz cerca de 70% dos níveis de nitrito (MATHEUS *et al.*, 2006, PASSOS *et al.*, 2015, SOARES *et al.*, 2012, SOARES *et al.*, 2013).

Tem sido relatado na literatura a melhoria da atividade anti-oxidante da rutina, quando acilada, relativamente à oxidação de lípidos (KATSOURA *et al.*, 2006, LUE *et al.*, 2010, VISKUPICOVA *et al.*, 2010). No entanto, esses estudos demonstram que a melhoria na atividade deste flavonol decorre do aumento na solubilidade no meio não-aquoso, não estando relacionada com uma amplificação da atividade anti-oxidante *per si*. No estudo feito por KATSOURA *et al.*, 2006, a acilação da rutina na posição 4'', por ácido oléico (C18:1) gera uma melhoria no efeito antioxidante, verificado em modelos experimentais de oxidação de LDL e ainda num modelo sérico *in vitro*. Tal efeito decorre, provavelmente, da melhoria da incorporação do composto na parte lipídica da partícula de LDL, atingindo o local da peroxidação lipídica (KATSOURA *et al.*, 2006).

7.4. Análise por *Western Blot* da expressão da iNOS

Com o objetivo de investigar se os polifenóis estudados influenciam a expressão da isoforma indutível da sintase do óxido nítrico, realizou-se o ensaio de *Western Blot* em lisados de macrófagos. As experiências foram desenvolvidas para o butirato de naringina (400 μM) e o dipropionato de rutina (300 μM) na presença e ausência de LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), a polidatina não foi avaliada devido a sua expressiva citotoxicidade, sendo este composto e seus derivados reservados para futuros testes quanto a sua atividade antitumoral. A expressão da iNOS é apresentada relativamente à expressão da tubulina, utilizada como padrão interno, uma vez esta última não sofre alteração nas condições usadas no ensaio.

Como pode ser observado na figura 63, o dipropionato de rutina (300 μM) não modulou a expressão da iNOS. O resultado obtido indica que a atividade apresentada por este derivado da rutina está estritamente relacionada com a sua ação *scavenger* de NO. Estes resultados corroboram os obtidos nas experiências de produção de NO em macrófagos e de SNAP como doador de NO. Considerando a semelhança dos resultados apresentados pela rutina e o diacetato de rutina, pode-se inferir que o mecanismo pelo qual esses compostos reduzem a concentração de óxido nítrico é similar ao apresentado pelo derivado diapropionato.

O butirato de naringina teve como veículo o etanol (0,8%) e tal como pode ser observado na figura 63, o etanol reduziu a expressão da iNOS em 74%. A fim de visualizar corretamente o efeito do butirato de naringina na expressão da iNOS, a condição contendo etanol (0,8%) e LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) foi considerada como controle (Figura 64).

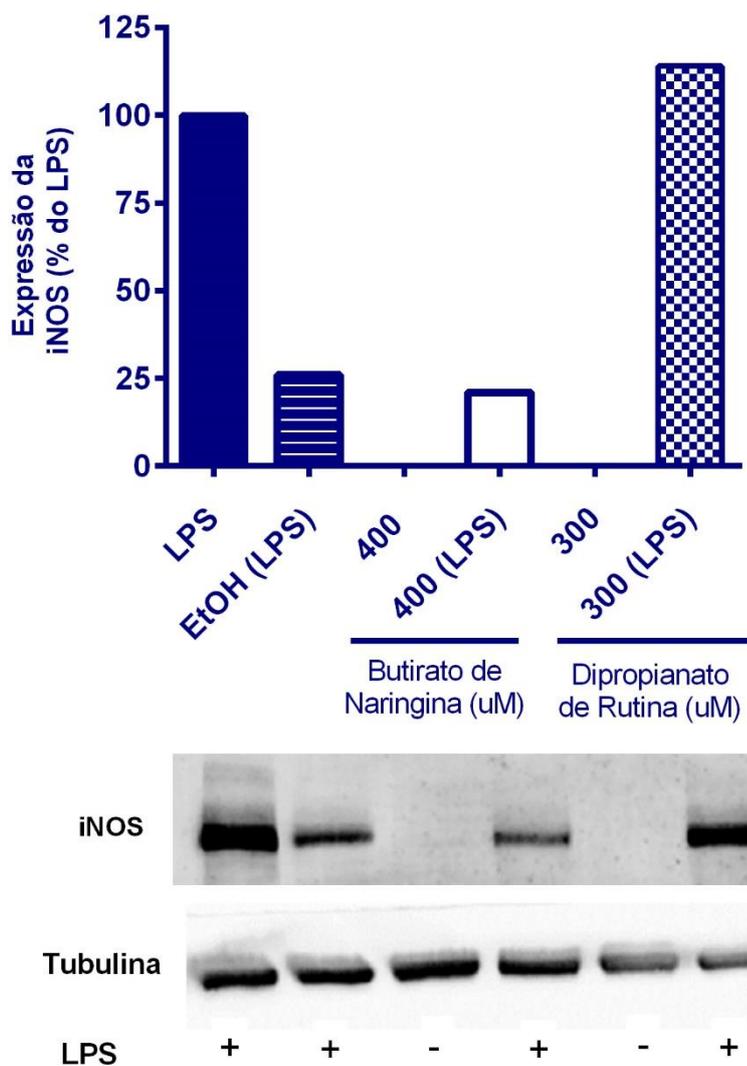


Figura 63. Expressão da iNOS na presença e ausência de LPS (1µg/ml). Os resultados são expressos em % de iNOS das células estimuladas com LPS (N=1). O etanol foi usado como veículo para o butirato de naringina. As percentagens foram calculadas considerando a expressão da iNOS relativamente à tubulina (iNOS/tubulina).

Como pode ser observado na figura 64, o butirato de naringina (400 µM) inibe em 32% a expressão da iNOS. Este resultado é muito semelhante ao obtido na experiência que avalia a produção de óxido nítrico por macrófagos, onde o butirato de naringina 400 µM inibe em cerca de 35% ($p < 0,0001$; SEM: 1) a produção de NO (Figura 58). Este resultado sugere que o butirato de naringina apresenta potencial anti-inflamatório, uma vez que inibe a expressão da iNOS e consequentemente a produção de NO, provavelmente por modular a via do NF- κ B.

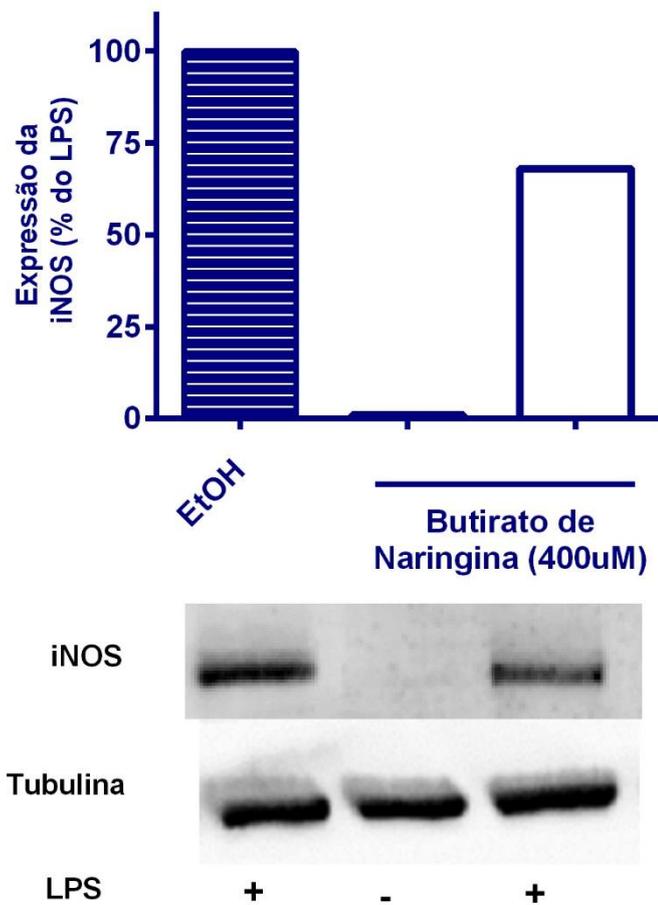


Figura 64. Expressão da iNOS na presença e ausência de LPS (1µg/ml), considerando o etanol com LPS como controle (N=1). As percentagens foram calculadas considerando a expressão da iNOS relativamente à tubulina (iNOS/tubulina).

Parte V

Conclusões e perspectivas

8. Conclusões e perspectivas

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que os compostos avaliados e seus derivados reduzem a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS.

Nessas condições, a rutina e seus derivados inibem em cerca de 30% a 20% a produção de NO, de uma forma não dependente da dose. Apesar de serem mais lipofílicos, os derivados 3'',4'''- diacetato e 3'',4'''- dipropionato apresentaram uma atividade semelhante à rutina, mostrando alguma inespecificidade no seu efeito. O ensaio do SNAP mostrou que a atividade *antioxidante* do NO é similar à atividade inibidora da produção de NO em macrófagos, o que sugere que o efeito da rutina e derivados está relacionada com a atividade *scavenger* desses compostos e não com a modulação da produção de óxido nítrico pela iNOS. A fim de confirmar essa hipótese, foi realizado o ensaio de *Western Blotting* para detetar a expressão da iNOS na presença do dipropionato de rutina (300 µM). O resultado obtido indica que este composto não interfere com a expressão da iNOS, confirmando que a redução da produção de óxido nítrico por macrófagos cultivados com dipropionato de rutina decorre estritamente da sua ação antioxidante (Tabela 14). Devido à semelhança dos resultados, essa conclusão poderá ser estendida à rutina e seu derivado diacetato. Como perspectiva futura, será relevante explorar a relação estrutura/atividade de derivados acilados da rutina, uma vez que a mesma é usada como controlo positivo em testes de captação de NO.

A naringina foi testada numa gama de concentrações que variaram entre 25 µM e 400 µM, ocorrendo inibição da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS apenas para a concentração de 400µM. O derivado acetato também apresenta atividade apenas a 400 µM, enquanto que os derivados diacetato e dibutirato apresentaram, respectivamente, atividade nas concentrações de 250 µM e 200 µM; 400 µM, 200 µM e 100µM, mostrando que as alterações físico-químicas proporcionadas pelas acilações melhoraram a atividade desses compostos, tornando-os mais ativos. O ensaio que avaliou a capacidade de captação do óxido nítrico

libertado pelo SNAP, mostrou que esses compostos apresentaram atividade *scavenger* pouco significativa, sendo que o diacetato, o butirato e a naringina apresentaram pequena atividade entre 7% e 12% (Figura 53). Estes resultados indicam que a naringina e derivados inibem a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS provavelmente por atuarem na expressão da iNOS. Visando avaliar a veracidade dessa hipótese, foi realizado o ensaio de *Western Blotting* para a iNOS na presença do butirato de naringina (400 μ M). O resultado obtido revelou que esse composto inibiu a expressão da iNOS de forma muito semelhante à inibição apresentada para a produção de NO por macrófagos, sugerindo que o butirato de naringina apresenta atividade anti-inflamatória, e atua muito possivelmente modulando a via do NF-kB (Tabela 14). Como perspectiva futura, a relação estrutura-atividade desses compostos deverá ser explorada, bem como o seu mecanismo de ação ao nível das vias de sinalização intracelular.

A polidatina foi testada nas concentrações entre 300 μ M e 25 μ M e demonstrou atividade expressiva na inibição da produção de NO em macrófagos estimulados com LPS (inibição de cerca de 56% para a concentração de 300 μ M). O ensaio feito com o SNAP mostrou que apenas a polidatina apresenta atividade *scavenger* para o NO, reduzindo sua concentração em cerca de 15% a 300 μ M e 10% a 200 μ M. Os derivados acilados 6"- cinamato de polidatina e 3"-6"- dibutirato de polidatina mostraram expressiva citotoxicidade, levando a morte celular em concentrações onde a polidatina apresentou apenas atividade na inibição da concentração de NO pelos macrófagos (Tabela 14). As alterações estruturais geradas na polidatina não modificaram significativamente a atividade anti-inflamatória desse composto. Os derivados citotóxicos obtidos a partir da polidatina serão futuramente avaliados relativamente à sua atividade antitumoral, visto que os estilbenos se têm revelados promissores na área da oncologia.

Tabela 14. Tabela resumo dos resultados obtidos para naringina, rutina, polidatina e seus derivados acilados.

Composto	Inibição da produção de NO	Citotoxicidade	Atividade Scavenger NO	Expressão da iNOS
Rutina	26 % (300 µM)	Não tóxico	30% (300 µM)	Não testada
3''-4''-Diacetato de rutina	21% (300 µM)	Não tóxico	23% (300 µM)	Não testada
3''-4''-Dipropionato de rutina	30% (300 µM)	Não tóxico	30% (300 µM)	Não inibe
Polidatina	56% (300 µM)	Não tóxico	15 % (300 µM)	Não testado
6''-Cinamato de polidatina	Sem atividade	93% (300µM)	Sem atividade	Não testada
3''-6''- Dibutirato de polidatina	Sem atividade	98% (300µM)	Sem atividade	Não testada
Naringina	38% (400 µM)	Não tóxico	11% (400 µM)	Não testada
6''- Acetato de naringina	26% (400 µM)	Não tóxico	Sem atividade	Não testada
6'' – Butirato de Naringina	34,5% (400 µM)	Não tóxico	12% (400 µM)	32% (400µM)
4''-6''- Diacetato de Naringina	43% (250µM)	Não tóxico	10% (250µM)	Não testada

Parte VI

Referências Bibliográficas

9. Referências

- ABBAS, Abul K; FAUSTO, Nelson; MITCHELL, Richard N[et al.] - **Robbins Patologia Básica**. Elsevier Brasil, 2008. 8535227296
- ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv - **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015. 853528320X
- ABRAHAM, Edward - Anti-cytokine therapy. **The sepsis text**. Springer, 2002. 079237620X
- ADAMS, LB; DINAUER, MC; MORGENSTERN, DE[et al.] - **Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice**. *Tubercle and Lung Disease*. Vol. 78. n.º 5 (1997). pp. 237-246. 0962-8479
- ADIABOUAH ACHY-BROU, Christelle A; BILLACK, Blase - **A comparative assessment of the cytotoxicity and nitric oxide reducing ability of resveratrol, pterostilbene and piceatannol in transformed and normal mouse macrophages**. *Drug and chemical toxicology*. (2016). pp. 1-11. 0148-0545
- ADLERCREUTZ, Patrick - **Immobilisation and application of lipases in organic media**. *Chemical Society Reviews*. Vol. 42. n.º 15 (2013). pp. 6406-6436.
- AGGARWAL, Bharat B; BHARDWAJ, Anjana; AGGARWAL, Rishi S[et al.] - **Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies**. *Anticancer research*. Vol. 24. n.º 5A (2004). pp. 2783-2840. 0250-7005
- AGGARWAL, Bharat B; VIJAYALEKSHMI, RV; SUNG, Bokyung - **Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe**. *Clinical Cancer Research*. Vol. 15. n.º 2 (2009). pp. 425-430. 1078-0432
- AGOSTINI-COSTA, Tânia da S; SILVEIRA, Dâmaris; BIZZO, Humberto R[et al.] - **Secondary metabolites**. INTECH Open Access Publisher, 2012. 9535103571
- AHERNE, S Aisling; O'BRIEN, Nora M - **Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism**. *Nutrition*. Vol. 18. n.º 1 (2002). pp. 75-81. 0899-9007
- AHMAD, Sheikh Fayaz; ATTIA, Sabry M; BAKHEET, Saleh A[et al.] - **Naringin attenuates the development of carrageenan-induced acute lung inflammation through inhibition of NF- κ B, STAT3 and pro-inflammatory mediators and enhancement of I κ B α and anti-inflammatory cytokines**. *Inflammation*. Vol. 38. n.º 2 (2015). pp. 846-857. 0360-3997
- AKTAN, Fugen - **iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation**. *Life sciences*. Vol. 75. n.º 6 (2004). pp. 639-653. 0024-3205
- AL-DHABI, Naif Abdullah; ARASU, Mariadhas Valan; PARK, Chang Ha[et al.] - **Letter to the editor: AN UP-TO-DATE REVIEW OF RUTIN AND ITS BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES**. (2015).
- ALAM, M Ashraful; SUBHAN, Nusrat; RAHMAN, M Mahbubur[et al.] - **Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action**. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. Vol. 5. n.º 4 (2014). pp. 404-417. 2156-5376

- ALAM, Md Ashraful; KAUTER, Kathleen; BROWN, Lindsay - **Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats.** *Nutrients*. Vol. 5. n.º 3 (2013). pp. 637-650.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian[et al.] - **Biologia molecular da célula.** Artmed Editora, 2009. 8536321709
- AMARETTI, Alberto; RAIMONDI, Stefano; LEONARDI, Alan[et al.] - **Hydrolysis of the Rutinose-Conjugates Flavonoids Rutin and Hesperidin by the Gut Microbiota and Bifidobacteria.** *Nutrients*. Vol. 7. n.º 4 (2015). pp. 2788-2800.
- ANOBOM, Cristiane D; PINHEIRO, Anderson S; DE-ANDRADE, Rafael A[et al.] - **From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases.** *BioMed research international*. Vol. 2014. (2014). 2314-6133
- APPEL, Lawrence J; MOORE, Thomas J; OBARZANEK, Eva[et al.] - **A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure.** *New England Journal of Medicine*. Vol. 336. n.º 16 (1997). pp. 1117-1124. 0028-4793
- ARDHAOU, Melika; FALCIMAIGNE, Aude; ENGASSER, Jean-Marc[et al.] - **Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 29. n.º 1 (2004). pp. 63-67. 1381-1177
- ARTERO, Ana; ARTERO, Arturo; TARÍN, Juan J[et al.] - **The impact of moderate wine consumption on health.** *Maturitas*. Vol. 80. n.º 1 (2015). pp. 3-13. 0378-5122
- ARTS, Ilja CW; SESINK, Aloys LA; FAASSEN-PETERS, Maria[et al.] - **The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides.** *British Journal of Nutrition*. Vol. 91. n.º 06 (2004). pp. 841-847. 1475-2662
- ASFAR, Sami; ABDEEN, Suad; DASHTI, Hussein[et al.] - **Effect of green tea in the prevention and reversal of fasting-induced intestinal mucosal damage.** *Nutrition*. Vol. 19. n.º 6 (2003). pp. 536-540. 0899-9007
- AUGUST, David A; LANDAU, Janelle; CAPUTO, Deborah[et al.] - **Ingestion of green tea rapidly decreases prostaglandin E2 levels in rectal mucosa in humans.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. Vol. 8. n.º 8 (1999). pp. 709-713. 1055-9965
- AZEVEDO, Maria Isabel; PEREIRA, Anamaria Falcão; NOGUEIRA, Ricardo Braz[et al.] - **The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy.** *Molecular pain*. Vol. 9. n.º 1 (2013). p. 1. 1744-8069
- AZIZ, Z; TANG, WL; CHONG, NJ[et al.] - **A systematic review of the efficacy and tolerability of hydroxyethylrutosides for improvement of the signs and symptoms of chronic venous insufficiency.** *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. Vol. 40. n.º 2 (2015). pp. 177-185. 1365-2710
- AZMI, Asfar Sohail; BHAT, Showket Hussain; HANIF, Sarmad[et al.] - **Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties.** *FEBS letters*. Vol. 580. n.º 2 (2006). pp. 533-538. 1873-3468

- BABIOR, Bernard M - **NADPH oxidase: an update.** *Blood*. Vol. 93. n.º 5 (1999). pp. 1464-1476. 0006-4971
- BAILEY, David G; ARNOLD, J Malcolm O; MUNOZ, Claudio[et al.] - **Grapefruit juice–felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 53. n.º 6 (1993). pp. 637-642. 1532-6535
- BAILEY, David G; KREEFT, John H; MUNOZ, Claudio[et al.] - **Grapefruit juice—felodipine interaction: Effect of naringin and 6', 7'-dihydroxybergamottin in humans.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 64. n.º 3 (1998). pp. 248-256. 1532-6535
- BAILEY, DG; DRESSER, GK; LEAKE, BF[et al.] - **Naringin is a Major and Selective Clinical Inhibitor of Organic Anion-Transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2) in Grapefruit Juice.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 81. n.º 4 (2007). pp. 495-502. 1532-6535
- BAKER, Dwight D; CHU, Min; OZA, Uma[et al.] - **The value of natural products to future pharmaceutical discovery.** *Natural product reports*. Vol. 24. n.º 6 (2007). pp. 1225-1244.
- BALAKIN, Konstantin V; IVANENKOV, Yan A; SKORENKO, Andrey V[et al.] - **In silico estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening.** *Journal of biomolecular screening*. Vol. 9. n.º 1 (2004). pp. 22-31. 1087-0571
- BEERENS, Koen; DESMET, Tom; SOETAERT, Wim - **Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars.** *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. Vol. 39. n.º 6 (2012). pp. 823-834. 1367-5435
- BELAAOUAJ, Abderrazzaq; MCCARTHY, Ronald; BAUMANN, Mary[et al.] - **Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis.** *Nature medicine*. Vol. 4. n.º 5 (1998). pp. 615-618. 1078-8956
- BENTLEY, Ronald - **Secondary metabolite biosynthesis: the first century.** *Critical reviews in biotechnology*. Vol. 19. n.º 1 (1999). pp. 1-40. 0738-8551
- BERGHAUS, Londa J; MOORE, James N; HURLEY, David J[et al.] - **Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4.** *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. Vol. 33. n.º 5 (2010). pp. 443-454. 0147-9571
- BERGLUND, Per - **Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis.** *Biomolecular Engineering*. Vol. 18. n.º 1 (2001). pp. 13-22. 1389-0344
- BHARTI, Saurabh; RANI, Neha; KRISHNAMURTHY, Bhaskar[et al.] - **Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review.** *Planta medica*. Vol. 80. n.º 6 (2014). pp. 437-451. 0032-0943
- Bi, Cheng; JIANG, Yinong; FU, Tingting[et al.] - **Naringin inhibits lipopolysaccharide-induced damage in human umbilical vein endothelial cells via attenuation of inflammation, apoptosis and MAPK pathways.** *Cytotechnology*. (2016). pp. 1-15. 0920-9069
- BILLACK, Blase; RADKAR, Vijayalaxmi; ADIABOUAH, Christelle - **In vitro evaluation of the cytotoxic and anti-proliferative properties of resveratrol and several of its**

- analogues.** *Cellular & molecular biology letters*. Vol. 13. n.º 4 (2008). pp. 553-569. 1425-8153
- BOGDAN, Christian - **Nitric oxide and the immune response.** *Nature immunology*. Vol. 2. n.º 10 (2001). pp. 907-916.
- BOMMARIUS, Andreas S; RIEBEL-BOMMARIUS, Bettina R - **Biocatalysis: fundamentals and applications.** John Wiley & Sons, 2004. 3527303448
- BORGENDORF, R; WARWEL, S - **Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis-and trans-9-octadecenoic acid.** *Applied microbiology and biotechnology*. Vol. 51. n.º 4 (1999). pp. 480-485. 0175-7598
- BORRELLI, Grazia M; TRONO, Daniela - **Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications.** *International journal of molecular sciences*. Vol. 16. n.º 9 (2015). pp. 20774-20840.
- BOURGAUD, F; GRAVOT, A; MILESI, S[et al.] - **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** *Plant science*. Vol. 161. n.º 5 (2001). pp. 839-851. 0168-9452
- BOWIE, ANDREW; O'NEILL, LUKE - **The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity.** (2013).
- BRADAMANTE, Silvia; BARENGHI, Livia; VILLA, Alessandro - **Cardiovascular protective effects of resveratrol.** *Cardiovascular drug reviews*. Vol. 22. n.º 3 (2004). pp. 169-188. 1527-3466
- BRENNAN, Robert E; RUSSELL, Kasi; ZHANG, Guoquan[et al.] - **Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections.** *Infection and immunity*. Vol. 72. n.º 11 (2004). pp. 6666-6675. 0019-9567
- BRISDELLI, Fabrizia; D'ANDREA, Gabriele; BOZZI, Argante - **Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties (review).** *Current drug metabolism*. Vol. 10. n.º 6 (2009). pp. 530-546. 1389-2002
- BRUNTON, Laurence L; CHABNER, Bruce; KNOLLMANN, Björn C - **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** McGraw-Hill Medical New York, 2011.
- BUCZYNSKI, Matthew W; STEPHENS, Daren L; BOWERS-GENTRY, Rebecca C[et al.] - **TLR-4 and sustained calcium agonists synergistically produce eicosanoids independent of protein synthesis in RAW264. 7 cells.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282. n.º 31 (2007). pp. 22834-22847. 0021-9258
- BURKON, Alexander; SOMOZA, Veronika - **Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides—Two novel resveratrol metabolites in human plasma.** *Molecular nutrition & food research*. Vol. 52. n.º 5 (2008). pp. 549-557. 1613-4133
- BUTLER, M. S. - **The role of natural product chemistry in drug discovery.** *J Nat Prod*. Vol. 67. n.º 12 (2004). pp. 2141-53. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620274>>. 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking)
- BUTLER, Mark S - **Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials.** *Natural product reports*. Vol. 25. n.º 3 (2008). pp. 475-516.

- CALABRISO, Nadia; SCODITTI, Egeria; MASSARO, Marika[et al.] - **Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression.** *European journal of nutrition.* (2015). pp. 1-13. 1436-6207
- CAO, Xvhai; LIN, Weilong; LIANG, Chengwei[et al.] - **Naringin rescued the TNF- α -induced inhibition of osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by depressing the activation of NF- κ B signaling pathway.** *Immunologic research.* Vol. 62. n.º 3 (2015). pp. 357-367. 0257-277X
- CARDOSO, Elsa - Visão Global do sistema imunológico. Em (AROSA, F., CARDOSO, E. & PACHECO, F.) **Fundamentos de imunologia.** Lisboa, Portugal: LIDEL, 2012. 978-972-757-856-6
- CARREA, Giacomo; RIVA, Sergio - **Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents.** *Angewandte Chemie International Edition.* Vol. 39. n.º 13 (2000). pp. 2226-2254. 1521-3773
- CARVALHO, Ana Caroline Lustosa de Melo; FONSECA, Thiago de Sousa; MATTOS, Marcos Carlos de[et al.] - **Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates.** *International journal of molecular sciences.* Vol. 16. n.º 12 (2015). pp. 29682-29716.
- CASAS-GODOY, Leticia; DUQUESNE, Sophie; BORDES, Florence[et al.] - **Lipases: an overview.** *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols.* (2012). pp. 3-30. 1617795992
- CHAN, Marion Man-Ying; MATTIACCI, John A; HWANG, Hyon S[et al.] - **Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway.** *Biochemical pharmacology.* Vol. 60. n.º 10 (2000). pp. 1539-1548. 0006-2952
- CHEBIL, Latifa; HUMEAU, Catherine; FALCIMAIGNE, Aude[et al.] - **Enzymatic acylation of flavonoids.** *Process Biochemistry.* Vol. 41. n.º 11 (2006). pp. 2237-2251. 1359-5113
- CHEN, Grace Y; NUÑEZ, Gabriel - **Sterile inflammation: sensing and reacting to damage.** *Nature Reviews Immunology.* Vol. 10. n.º 12 (2010). pp. 826-837. 1474-1733
- CHEN, Lvyi; LAN, Zhou; LIN, Qinxiong[et al.] - **Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice.** *Food and chemical toxicology.* Vol. 52. (2013). pp. 28-35. 0278-6915
- CHEN, Yen-Chou; SHEN, Shing-Chuan; LEE, Woan-Ruoh[et al.] - **Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages.** *Journal of cellular biochemistry.* Vol. 82. n.º 4 (2001). pp. 537-548. 1097-4644
- CHEN, Yupin; ZHANG, Dong-qi; LIAO, Zhong[et al.] - **Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease.** *Molecular neurodegeneration.* Vol. 10. n.º 1 (2015). p. 4. 1750-1326

- CHEYNIER, Véronique; COMTE, Gilles; DAVIES, Kevin M[et al.] - **Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology.** *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 72. (2013). pp. 1-20. 0981-9428
- CHONG, Julie; POUTARAUD, Anne; HUGUENEY, Philippe - **Metabolism and roles of stilbenes in plants.** *Plant Science*. Vol. 177. n.º 3 (2009). pp. 143-155. 0168-9452
- CHOVATIYA, Raj; MEDZHITOV, Ruslan - **Stress, inflammation, and defense of homeostasis.** *Molecular cell*. Vol. 54. n.º 2 (2014). pp. 281-288. 1097-2765
- CHTOUROU, Yassine; AOUEY, Bakhta; KEBIECHE, Mohammed[et al.] - **Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-mediated NF- κ B and P53 signaling pathways.** *Chemico-biological interactions*. Vol. 239. (2015). pp. 76-86. 0009-2797
- CHTOUROU, Yassine; AOUEY, Bakhta; AROUI, Sonia[et al.] - **Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat.** *Chemico-biological interactions*. Vol. 243. (2016). pp. 1-9. 0009-2797
- CHUA, Lee Suan - **A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities.** *Journal of ethnopharmacology*. Vol. 150. n.º 3 (2013). pp. 805-817. 0378-8741
- CIRINO, Patrick C; ARNOLD, Frances H - **Protein engineering of oxygenases for biocatalysis.** *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol. 6. n.º 2 (2002). pp. 130-135. 1367-5931
- CONESKI, Peter N; SCHOENFISCH, Mark H - **Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting.** *Chemical Society Reviews*. Vol. 41. n.º 10 (2012). pp. 3753-3758.
- COUSSENS, Lisa M; WERB, Zena - **Inflammation and cancer.** *Nature*. Vol. 420. n.º 6917 (2002). pp. 860-867. 0028-0836
- CROFT, Kevin D - **Dietary polyphenols: Antioxidants or not?** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 595. (2016). pp. 120-124. 0003-9861
- CROTEAU, Rodney; KUTCHAN, Toni M; LEWIS, Norman G - **Natural products (secondary metabolites).** *Biochemistry and molecular biology of plants*. Vol. 24. (2000). pp. 1250-1319.
- CROZIER, Alan; DEL RIO, Daniele; CLIFFORD, Michael N - **Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds.** *Molecular aspects of medicine*. Vol. 31. n.º 6 (2010). pp. 446-467. 0098-2997
- CROZIER, Alan; JAGANATH, Indu B; CLIFFORD, Michael N - **Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.** *Natural product reports*. Vol. 26. n.º 8 (2009). pp. 1001-1043.
- CRUVINEL, Wilson de Melo; MESQUITA JÚNIOR, Danilo; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira[et al.] - **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** *Rev. bras. reumatol.* Vol. 50. n.º 4 (2010). pp. 434-447. 0482-5004
- CZOCK, David; KELLER, Frieder; RASCHE, Franz Maximilian[et al.] - **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids.** *Clinical pharmacokinetics*. Vol. 44. n.º 1 (2005). pp. 61-98. 0312-5963

- D ARCHIVIO, Massimo; FILESI, Carmela; DI BENEDETTO, Roberta[et al.] - **Polyphenols, dietary sources and bioavailability.** *Annali-Istituto Superiore di Sanita.* Vol. 43. n.º 4 (2007). p. 348. 0021-2571
- DAMODARAN, Srinivasan - Water at Biological Phase Boundaries: Its Role in Interfacial Activation of Enzymes and Metabolic Pathways. **Membrane Hydration.** Springer, 2015. 3319190598
- DE MIRANDA, Amanda S; MIRANDA, Leandro SM; DE SOUZA, Rodrigo OMA - **Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions.** *Biotechnology Advances.* Vol. 33. n.º 5 (2015). pp. 372-393. 0734-9750
- DEWICK, Paul M - **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** John Wiley & Sons, 2002. 0471496413
- DI, Li; KERNS, Edward H - **Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization.** *Drug discovery today.* Vol. 11. n.º 9 (2006). pp. 446-451. 1359-6446
- DINARELLO, Charles A - **Anti-inflammatory agents: present and future.** *Cell.* Vol. 140. n.º 6 (2010). pp. 935-950. 0092-8674
- DORDICK, Jonathan S - **Biocatalysts for industry.** Springer Science & Business Media, 2013. 1475745974
- DU, Qiao-Hui; PENG, Cheng; ZHANG, Hong - **Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics.** *Pharmaceutical biology.* Vol. 51. n.º 11 (2013). pp. 1347-1354. 1388-0209
- EMPL, Michael T; ALBERS, Malena; WANG, Shan[et al.] - **The Resveratrol Tetramer r-Viniferin Induces a Cell Cycle Arrest Followed by Apoptosis in the Prostate Cancer Cell Line LNCaP.** *Phytotherapy Research.* Vol. 29. n.º 10 (2015). pp. 1640-1645. 1099-1573
- ERRANTE, Paolo Ruggero; MENEZES-RODRIGUES, Francisco Sandro; TAVARES, José Gustavo Padrão[et al.] - **Mecanismo de Ação e Resistência ao Uso de Glicocorticóides.** *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica.* Vol. 6. n.º 2 (2015).
- FABRIS, Sabrina; MOMO, Federico; RAVAGNAN, Giampietro[et al.] - **Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes.** *Biophysical chemistry.* Vol. 135. n.º 1 (2008). pp. 76-83. 0301-4622
- FEELISCH, Martin - **The use of nitric oxide donors in pharmacological studies.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* Vol. 358. n.º 1 (1998). pp. 113-122. 0028-1298
- FEGHALI, Carol A; WRIGHT, Timothy M - **Cytokines in acute and chronic inflammation.** *Front Biosci.* Vol. 2. n.º 1 (1997). pp. d12-d26.
- FELGINES, Catherine; TEXIER, Odile; MORAND, Christine[et al.] - **Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* Vol. 279. n.º 6 (2000). pp. G1148-G1154. 0193-1857
- FIELD, Lamar; DILTS, Robert V; RAVICHANDRAN, Ramanathan[et al.] - **An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D, L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1, 1-dimethylethyl thionitrite.**

Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. n.º 6 (1978). pp. 249-250.

- FLAMINI, Riccardo; MATTIVI, Fulvio; ROSSO, Mirko De[et al.] - **Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols**. *International journal of molecular sciences*. Vol. 14. n.º 10 (2013). pp. 19651-19669.
- FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C - **Nitric oxide synthases: regulation and function**. *European heart journal*. Vol. 33. n.º 7 (2012). pp. 829-837. 0195-668X
- FRAGA, Cesar G.; GALLEANO, Monica; VERSTRAETEN, Sandra V.[et al.] - **Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols**. *Molecular aspects of medicine*. Vol. 31. n.º 6 (2010). pp. 435-445. 0098-2997
- FRASER, Christopher C - **Exploring the positive and negative consequences of NF- κ B inhibition for the treatment of human disease**. *Cell Cycle*. Vol. 5. n.º 11 (2006). pp. 1160-1163. 1538-4101
- FUGGETTA, Mariapia; MATTIVI, Fulvio - **The immunomodulating activities of resveratrol glucosides in humans**. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*. Vol. 3. n.º 2 (2011). pp. 81-90. 2212-7984
- FUHR, Uwe; KUMMERT, Anja L - **The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions?** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 58. n.º 4 (1995). pp. 365-373. 1532-6535
- FUJIWARA, Nagatoshi; KOBAYASHI, Kazuo - **Macrophages in inflammation**. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. Vol. 4. n.º 3 (2005). pp. 281-286. 1568-010X
- GAMBINI, J; INGLÉS, M; OLASO, G[et al.] - **Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans**. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Vol. 2015. (2015). 1942-0900
- GANDHI, Neena N; SAWANT, Sudhirprakash B; JOSHI, Jyeshtharaj B - **Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol**. *Biotechnology progress*. Vol. 11. n.º 3 (1995). pp. 282-287. 8756-7938
- GAO, Mingming; MA, Yongjie; LIU, Dexi - **Rutin suppresses palmitic acids-triggered inflammation in macrophages and blocks high fat diet-induced obesity and fatty liver in mice**. *Pharmaceutical research*. Vol. 30. n.º 11 (2013). pp. 2940-2950. 0724-8741
- GARCÍA-LAFUENTE, Ana; GUILLAMÓN, Eva; VILLARES, Ana[et al.] - **Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease**. *Inflammation Research*. Vol. 58. n.º 9 (2009). pp. 537-552. 1023-3830
- GILMORE, Thomas D; GARBATI, Michael R - Inhibition of NF- κ B signaling as a strategy in disease therapy. **NF- κ B in Health and Disease**. Springer, 2010. 3642160166
- GILROY, Derek; DE MAEYER, Roel - **New insights into the resolution of inflammation**. *Seminars in immunology*. Vol. 27. n.º 3 (2015). pp. 161-168. 1044-5323
- GONÇALVES, Caroline da; MARSAIOLI, Anita J - **Biocatalysis: facts and trends**. *Química Nova*. Vol. 36. n.º 10 (2013). pp. 1587-1590. 0100-4042

- GREEN, Laura C; WAGNER, David A; GLOGOWSKI, Joseph[et al.] - **Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids.** *Analytical biochemistry.* Vol. 126. n.º 1 (1982). pp. 131-138. 0003-2697
- GREENBERG, Steven; GRINSTEIN, Sergio - **Phagocytosis and innate immunity.** *Current opinion in immunology.* Vol. 14. n.º 1 (2002). pp. 136-145. 0952-7915
- GRIVENNIKOV, Sergei I; GRETEN, Florian R; KARIN, Michael - **Immunity, inflammation, and cancer.** *Cell.* Vol. 140. n.º 6 (2010). pp. 883-899. 0092-8674
- GUARDIA, Teresita; ROTELLI, Alejandra Ester; JUAREZ, Americo Osvaldo[et al.] - **Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat.** *Il farmaco.* Vol. 56. n.º 9 (2001). pp. 683-687. 0014-827X
- GUIDO, Rafael VC; ANDRICOPULO, Adriano D; OLIVA, Glaucius - **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** *estudos avançados.* Vol. 24. n.º 70 (2010). pp. 81-98. 0103-4014
- GUIHUA, Xiong; SHUYIN, Liu; JINLIANG, Gao[et al.] - **Naringin Protects Ovalbumin-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma.** *Inflammation.* Vol. 39. n.º 2 (2016). pp. 891-899. 0360-3997
- GUO, Yi; BRUNO, Richard S - **Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability.** *The Journal of nutritional biochemistry.* Vol. 26. n.º 3 (2015). pp. 201-210. 0955-2863
- GUON, Tae Eun; CHUNG, Ha Sook - **Hyperoside and rutin of Nelumbo nucifera induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells.** *Oncology Letters.* Vol. 11. n.º 4 (2016). pp. 2463-2470. 1792-1074
- GUPTA, R; GUPTA, N; RATHI, P - **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties.** *Applied microbiology and biotechnology.* Vol. 64. n.º 6 (2004). pp. 763-781. 0175-7598
- GUPTA, Subash C; SUNDARAM, Chitra; REUTER, Simone[et al.] - **Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms.* Vol. 1799. n.º 10 (2010). pp. 775-787. 1874-9399
- GURUVAYOORAPPAN, C; KUTTAN, Girija - **Rutin inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-α production in lipopolysaccharide and concanavalin-A stimulated macrophages.** *Drug metabolism and drug interactions.* Vol. 22. n.º 4 (2007). pp. 263-278. 2191-0162
- GUZIK, T; KORBUT, R; ADAMEK-GUZIK, T - **Nitric oxide and superoxide in inflammation.** *Journal of physiology and pharmacology.* Vol. 54. (2003). pp. 469-487.
- HADI, SM; BHAT, Showket H; AZMI, Asfar S[et al.] - **Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties.** In: *Seminars in cancer biology, 2007,*
- HALLIWELL, Barry; RAFTER, Joseph; JENNER, Andrew - **Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?** *The American journal of clinical nutrition.* Vol. 81. n.º 1 (2005). pp. 268S-276S. 0002-9165

- HALLIWELL, Barry; ZHAO, Kaicun; WHITEMAN, Matthew - **The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?** *Free radical research*. Vol. 33. n.º 6 (2000). pp. 819-830. 1071-5762
- HAN, Yongmoon - **Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*.** *International immunopharmacology*. Vol. 9. n.º 2 (2009). pp. 207-211. 1567-5769
- HARI KRISHNA, S; KARANTH, NG - **Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media.** *Catalysis Reviews*. Vol. 44. n.º 4 (2002). pp. 499-591. 0161-4940
- HARTLEY, Janet W; EVANS, Leonard H; GREEN, Kim Y[et al.] - **Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264. 7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line.** *Retrovirology*. Vol. 5. n.º 1 (2008). p. 1. 1742-4690
- HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul - **Industrial applications of microbial lipases.** *Enzyme and Microbial technology*. Vol. 39. n.º 2 (2006). pp. 235-251. 0141-0229
- HATTORI, Hiromi; TSUTSUKI, Hiroyasu; NAKAZAWA, Masami[et al.] - **Naringin lauroyl ester inhibits lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor κ B signaling in macrophages.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. (2016). pp. 1-7. 0916-8451
- HAYDEN, Matthew S; GHOSH, Sankar - **NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions.** *Genes & development*. Vol. 26. n.º 3 (2012). pp. 203-234. 0890-9369
- HE, Shan; YAN, Xiaojun - **From resveratrol to its derivatives: new sources of natural antioxidant.** *Current medicinal chemistry*. Vol. 20. n.º 8 (2013). pp. 1005-1017. 0929-8673
- HE, Y-D; LIU, Y-T; LIN, Q-X[et al.] - **Polydatin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo via reduced production of reactive oxygen species.** *British Journal of Dermatology*. Vol. 167. n.º 4 (2012). pp. 941-944. 1365-2133
- HENRY, Caroline; VITRAC, Xavier; DECENDIT, Alain[et al.] - **Cellular uptake and efflux of trans-piceid and its aglycone trans-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells.** *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol. 53. n.º 3 (2005). pp. 798-803. 0021-8561
- HOBBS, Adrian J; HIGGS, Annie; MONCADA, Salvador - **Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol. 39. n.º 1 (1999). pp. 191-220. 0362-1642
- HOLLEBEECK, Sylvie; RAAS, Thomas; PIRONT, Neil[et al.] - **Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model.** *Toxicology letters*. Vol. 206. n.º 3 (2011). pp. 268-275. 0378-4274
- HOLLMAN, Peter CH; CASSIDY, Aedin; COMTE, Blandine[et al.] - **The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established.** *The journal of Nutrition*. Vol. 141. n.º 5 (2011). pp. 989S-1009S. 0022-3166

- HONG, Jungil; SMITH, Theresa J; HO, Chi-Tang[et al.] - **Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase-and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues.** *Biochemical pharmacology*. Vol. 62. n.º 9 (2001). pp. 1175-1183. 0006-2952
- HOSSEINZADEH, Hossein; NASSIRI-ASL, Marjan - **Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid.** *Journal of endocrinological investigation*. Vol. 37. n.º 9 (2014). pp. 783-788. 1720-8386
- HSU, Chin-Lin; WU, Chi-Hao; HUANG, Shih-Li[et al.] - **Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats.** *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol. 57. n.º 2 (2009). pp. 425-431. 0021-8561
- HUSSAIN, Md Sarfaraj; FAREED, Sheeba; ANSARI, Saba[et al.] - **Current approaches toward production of secondary plant metabolites.** *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. Vol. 4. n.º 1 (2012). p. 10. 0975-7406
- IQBAL, Romaina; ANAND, Sonia; OUNPUU, Stephanie[et al.] - **Dietary Patterns and the Risk of Acute Myocardial Infarction in 52 Countries Results of the INTERHEART Study.** *Circulation*. Vol. 118. n.º 19 (2008). pp. 1929-1937. 0009-7322
- ISHIZAWA, Keisuke; YOSHIKAWA, Masanori; KAWAI, Yoshichika[et al.] - **Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis.** *Journal of pharmacological sciences*. Vol. 115. n.º 4 (2011). pp. 466-470. 1347-8613
- JAGANATH, Indu B; JAGANATH, Indu B; MULLEN, William[et al.] - **The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man.** *Free radical research*. Vol. 40. n.º 10 (2006). pp. 1035-1046. 1071-5762
- JAKUBOWSKA, Joanna; MIKUŁA-PIETRASIŁ, Justyna; KSIĄŻEK, Krzysztof[et al.] - **Cytotoxicity studies of novel combretastatin and pterostilbene derivatives.** *BioMed research international*. Vol. 2014. (2014). 2314-6133
- JEANDET, Philippe; DELAUNOIS, Bertrand; CONREUX, Alexandra[et al.] - **Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants.** *Biofactors*. Vol. 36. n.º 5 (2010). pp. 331-341. 1872-8081
- Ji, Hui; ZHANG, Xiangjian; DU, Yuanyuan[et al.] - **Polydatin modulates inflammation by decreasing NF-κB activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood-brain barrier permeability for its neuroprotective effect in pMCAO rat brain.** *Brain research bulletin*. Vol. 87. n.º 1 (2012). pp. 50-59. 0361-9230
- JIANG, Qi; Yi, Min; GUO, Qianqian[et al.] - **Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF-κB pathway.** *International immunopharmacology*. Vol. 29. n.º 2 (2015). pp. 370-376. 1567-5769
- JIAO, Hao-yan; SU, Wei-wei; LI, Pei-bo[et al.] - **Therapeutic effects of naringin in a guinea pig model of ovalbumin-induced cough-variant asthma.** *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. Vol. 33. (2015). pp. 59-65. 1094-5539

- JOSEPH, Shama V; EDIRISINGHE, Indika; BURTON-FREEMAN, Britt M - **Fruit polyphenols: a review of anti-inflammatory effects in humans.** *Critical reviews in food science and nutrition.* n.º just-accepted (2015). pp. 00-00. 1040-8398
- JUTRAS, Isabelle; DESJARDINS, Michel - **Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 21. (2005). pp. 511-527. 1081-0706
- KABERA, Justin N; SEMANA, Edmond; MUSSA, Ally R[et al.] - **Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* Vol. 2. (2014). pp. 377-392.
- KAMADA, Chiemi; DA SILVA, Edson L; OHNISHI-KAMEYAMA, Mayumi[et al.] - **Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit.** *Free radical research.* Vol. 39. n.º 2 (2005). pp. 185-194. 1071-5762
- KAMMALLA, Ananth Kumar; RAMASAMY, Mohan Kumar; CHINTALA, Jyothi[et al.] - **Comparative pharmacokinetic interactions of Quercetin and Rutin in rats after oral administration of European patented formulation containing Hippophae rhamnoides and Co-administration of Quercetin and Rutin.** *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics.* Vol. 40. n.º 3 (2015). pp. 277-284. 0378-7966
- KANAZE, FI; BOUNARTZI, MI; GEORGARAKIS, M[et al.] - **Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects.** *European journal of clinical nutrition.* Vol. 61. n.º 4 (2007). pp. 472-477. 0954-3007
- KANNO, Syu-ichi; SHOUJI, Ai; HIRATA, Riki[et al.] - **Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells.** *Life sciences.* Vol. 75. n.º 3 (2004). pp. 353-365. 0024-3205
- KANNO, Syu-ichi; SHOUJI, Ai; TOMIZAWA, Ayako[et al.] - **Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages.** *Life sciences.* Vol. 78. n.º 7 (2006). pp. 673-681. 0024-3205
- KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath - **Lipase promiscuity and its biochemical applications.** *Process Biochemistry.* Vol. 47. n.º 4 (2012). pp. 555-569. 1359-5113
- KASIOTIS, Konstantinos M; PRATSINIS, Harris; KLETSAS, Dimitris[et al.] - **Resveratrol and related stilbenes: their anti-aging and anti-angiogenic properties.** *Food and chemical toxicology.* Vol. 61. (2013). pp. 112-120. 0278-6915
- KATORI, M; MAJIMA, M - **Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors.** *Inflammation Research.* Vol. 49. n.º 8 (2000). pp. 367-392. 1023-3830
- KATSOURA, MH; POLYDERA, AC; TSIRONIS, L[et al.] - **Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency.** *Journal of biotechnology.* Vol. 123. n.º 4 (2006). pp. 491-503. 0168-1656

- KAUR, Sandeep; MUTHURAMAN, Arunachalam - **Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney one-clip model of renovascular hypertension in rat.** *Life sciences*. Vol. 150. (2016). pp. 89-94. 0024-3205
- KAUSS, Tina; MOYNET, Daniel; RAMBERT, Jérôme[et al.] - **Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis.** *Arthritis Research and Therapy*. Vol. 10. n.º 1 (2008). p. R19. 1478-6354
- KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo - **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.** *Nature immunology*. Vol. 11. n.º 5 (2010). pp. 373-384. 1529-2908
- KAWAI, Yoshichika; NISHIKAWA, Tomomi; SHIBA, Yuko[et al.] - **Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 283. n.º 14 (2008). pp. 9424-9434. 0021-9258
- KEMPERMAN, Robèr A; BOLCA, Selin; ROGER, Laure C[et al.] - **Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities.** *Microbiology*. Vol. 156. n.º 11 (2010). pp. 3224-3231. 1465-2080
- KIM, Han Hyuk; KIM, Dong Hee; KIM, Manh Heun[et al.] - **Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity.** *Archives of pharmacal research*. Vol. 36. n.º 12 (2013). pp. 1533-1540. 0253-6269
- KIM, Hee Kee; CHEON, Bong Sun; KIM, Young Ha[et al.] - **Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships.** *Biochemical pharmacology*. Vol. 58. n.º 5 (1999). pp. 759-765. 0006-2952
- KIM, Sung Kyu; KIM, Hyun Jung; CHOI, Sun Eun[et al.] - **Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg.** *Archives of pharmacal research*. Vol. 31. n.º 4 (2008). pp. 424-428. 0253-6269
- KLIEBENSTEIN, Daniel J - **Making new molecules—evolution of structures for novel metabolites in plants.** *Current opinion in plant biology*. Vol. 16. n.º 1 (2013). pp. 112-117. 1369-5266
- KODAN, Atsushi; KURODA, Hiroyuki; SAKAI, Fukumi - **A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 99. n.º 5 (2002). pp. 3335-3339. 0027-8424
- KOEHN, Frank E; CARTER, Guy T - **The evolving role of natural products in drug discovery.** *Nature reviews Drug discovery*. Vol. 4. n.º 3 (2005). pp. 206-220. 1474-1776
- KOELLER, Kathryn M; WONG, Chi-Huey - **Enzymes for chemical synthesis.** *Nature*. Vol. 409. n.º 6817 (2001). pp. 232-240. 0028-0836
- KOTAS, Maya E; MEDZHITOV, Ruslan - **Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility.** *Cell*. Vol. 160. n.º 5 (2015). pp. 816-827. 0092-8674

- KRENSKY, Alan M.; STROM, Terry B.; BLUESTONE, Jeffrey A. - **Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.
- KRISHNA, Sajja Hari - **Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media**. *Biotechnology advances*. Vol. 20. n.º 3 (2002). pp. 239-267. 0734-9750
- KROESEN, S; WIDMER, AF; TYNDALL, A[et al.] - **Serious bacterial infections in patients with rheumatoid arthritis under anti-TNF- α therapy**. *Rheumatology*. Vol. 42. n.º 5 (2003). pp. 617-621. 1462-0324
- KUMAGAI, Yutaro; AKIRA, Shizuo - **Identification and functions of pattern-recognition receptors**. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 125. n.º 5 (2010). pp. 985-992. 0091-6749
- KUMAR, Ashok; DHAR, Kartik; KANWAR, Shamsheer Singh[et al.] - **Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications**. *Biological procedures online*. Vol. 18. n.º 1 (2016). p. 1. 1480-9222
- KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo - **Pathogen recognition by the innate immune system**. *International reviews of immunology*. Vol. 30. n.º 1 (2011). pp. 16-34. 0883-0185
- KUO, Shu-Jung; PARKIN, Kirk L - **Substrate preferences for lipase-mediated acyl-exchange reactions with butteroil are concentration-dependent**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 70. n.º 4 (1993). pp. 393-399. 0003-021X
- KYUNG, Tae-Wook; LEE, Ji-Eun; SHIN, Hyun-Hee[et al.] - **Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- α by inhibiting activation of NF- κ B**. *Experimental & molecular medicine*. Vol. 40. n.º 1 (2008). pp. 52-58. 1226-3613
- LAMANO-CARVALHO, Teresa Lúcia - **Efeito dos anti-inflamatórios não-esteroidais convencionais e seletivos para cox-2 sobre o reparo ósseo**. *Acta ortop. bras*. Vol. 15. n.º 3 (2007). pp. 166-168. 1413-7852
- LANZILLI, Giulia; COTTARELLI, Andrea; NICOTERA, Giuseppe[et al.] - **Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation**. *Inflammation*. Vol. 35. n.º 1 (2012). pp. 240-248. 0360-3997
- LEE, Seung-Jae; LEE, Seung Yuan; HA, Hyun Joo[et al.] - **Rutin Attenuates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophage cells**. *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol. 3. n.º 3 (2015). pp. 202-205. 2333-1119
- LEE, Wonhwa; KU, Sae-Kwang; BAE, Jong-Sup - **Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo**. *Food and chemical toxicology*. Vol. 50. n.º 9 (2012). pp. 3048-3055. 0278-6915
- LI, Pengyun; WANG, Xingmin; ZHAO, Ming[et al.] - **Polydatin protects hepatocytes against mitochondrial injury in acute severe hemorrhagic shock via SIRT1-SOD2 pathway**. *Expert opinion on therapeutic targets*. Vol. 19. n.º 7 (2015). pp. 997-1010. 1744-7631
- LI, Shu-Qi; DONG, Shu; SU, Zhi-Heng[et al.] - **Comparative pharmacokinetics of naringin in rat after oral administration of Chaihu-Shu-Gan-San aqueous extract and naringin alone**. *Metabolites*. Vol. 3. n.º 4 (2013a). pp. 867-880.

- LI, Xiao-hui; GONG, Xia; ZHANG, Li[et al.] - **Protective effects of polydatin on septic lung injury in mice via upregulation of HO-1.** *Mediators of inflammation.* Vol. 2013. (2013b). 0962-9351
- LI, Zhi; VAN BEILEN, Jan B; DUETZ, Wouter A[et al.] - **Oxidative biotransformations using oxygenases.** *Current opinion in chemical biology.* Vol. 6. n.º 2 (2002). pp. 136-144. 1367-5931
- LIBERAL, Joana; FRANCISCO, Vera; COSTA, Gustavo[et al.] - **Bioactivity of *Fragaria vesca* leaves through inflammation, proteasome and autophagy modulation.** *Journal of ethnopharmacology.* Vol. 158. (2014). pp. 113-122. 0378-8741
- LIN, Shu Fu; LIN, Yu-Hsiang; LIN, Mengju[et al.] - **Synthesis and structure–activity relationship of 3-O-acylated (–)-epigallocatechins as 5 α -reductase inhibitors.** *European journal of medicinal chemistry.* Vol. 45. n.º 12 (2010). pp. 6068-6076. 0223-5234
- LIN, Tzu-hua; TAMAKI, Yasunobu; PAJARINEN, Jukka[et al.] - **Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- κ B as a therapeutic target.** *Acta biomaterialia.* Vol. 10. n.º 1 (2014). pp. 1-10. 1742-7061
- LIPPI, Giuseppe; FRANCHINI, Massimo; FAVALORO, Emmanuel J[et al.] - **Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the “French paradox”.** *Semin Thromb Hemost.* Vol. 36. n.º 1 (2010). pp. 59-70.
- LIU, Hong-Bao; MENG, Qiu-Hong; HUANG, Chen[et al.] - **Nephroprotective Effects of Polydatin against Ischemia/Reperfusion Injury: A Role for the PI3K/Akt Signal Pathway.** *Oxidative medicine and cellular longevity.* Vol. 2015. (2015). 1942-0900
- LIU, Long-tao; GUO, Gang; WU, Min[et al.] - **The progress of the research on cardiovascular effects and acting mechanism of polydatin.** *Chinese journal of integrative medicine.* Vol. 18. (2012). pp. 714-719. 1672-0415
- LIU, Simin; MANSON, JoAnn E; LEE, I-Min[et al.] - **Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study.** *The American journal of clinical nutrition.* Vol. 72. n.º 4 (2000). pp. 922-928. 0002-9165
- LONG, Kamariah; GHAZALI, Hasanah M; ARIFF, Arbakariya[et al.] - **Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link.** *Biotechnology letters.* Vol. 20. n.º 4 (1998). pp. 369-372. 0141-5492
- LUE, Bena-Marie; NIELSEN, Nina Skall; JACOBSEN, Charlotte[et al.] - **Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays.** *Food Chemistry.* Vol. 123. n.º 2 (2010). pp. 221-230. 0308-8146
- LUO, Yu-Long; ZHANG, Chen-Chen; LI, Pei-Bo[et al.] - **Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke.** *International immunopharmacology.* Vol. 13. n.º 3 (2012). pp. 301-307. 1567-5769
- LYU, Su-Yun; PARK, Won-Bong - **Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids.** *Archives of pharmacal research.* Vol. 28. n.º 5 (2005). pp. 573-581. 0253-6269

- MAKAROV, Sergei S - **NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances.** *Molecular medicine today*. Vol. 6. n.º 11 (2000). pp. 441-448. 1357-4310
- MANACH, Claudine; SCALBERT, Augustin; MORAND, Christine[et al.] - **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *The American journal of clinical nutrition*. Vol. 79. n.º 5 (2004). pp. 727-747. 0002-9165
- MANACH, Claudine; WILLIAMSON, Gary; MORAND, Christine[et al.] - **Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.** *The American journal of clinical nutrition*. Vol. 81. n.º 1 (2005). pp. 230S-242S. 0002-9165
- MANNA, K; DAS, U; DAS, D[et al.] - **Naringin inhibits gamma radiation-induced oxidative DNA damage and inflammation, by modulating p53 and NF- κ B signaling pathways in murine splenocytes.** *Free radical research*. Vol. 49. n.º 4 (2015). pp. 422-439. 1071-5762
- MARTINELLE, Mats; HOLMQUIST, Mats; HULT, Karl - **On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. Vol. 1258. n.º 3 (1995). pp. 272-276. 0005-2760
- MATHEUS, Maria Eline; DE OLIVEIRA FERNANDES, Sidnei Bessa; SILVEIRA, Cristiane Silva[et al.] - **Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression.** *Journal of ethnopharmacology*. Vol. 107. n.º 2 (2006). pp. 291-296. 0378-8741
- MATHEUS, ME; MANTOVANI, ISB; SANTOS, GB[et al.] - **Ação de extratos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 13. (2003). pp. 3-5. 0102-695X
- MAULUDIN, Rachmat; MÜLLER, Rainer H; KECK, Cornelia M - **Development of an oral rutin nanocrystal formulation.** *International journal of pharmaceutics*. Vol. 370. n.º 1 (2009a). pp. 202-209. 0378-5173
- MAULUDIN, Rachmat; MÜLLER, Rainer H; KECK, Cornelia M - **Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals.** *European journal of pharmaceutical sciences*. Vol. 36. n.º 4 (2009b). pp. 502-510. 0928-0987
- MCDONALD, Andrew G; BOYCE, Sinead; TIPTON, Keith F - **Enzyme classification and nomenclature.** *eLS*. (2000). 047001590X
- MEDZHITOV, Ruslan - **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature*. Vol. 454. n.º 7203 (2008). pp. 428-435. 0028-0836
- MEDZHITOV, Ruslan - **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell*. Vol. 140. n.º 6 (2010). pp. 771-776. 0092-8674
- MEDZHITOV, Ruslan; HORNG, Tiffany - **Transcriptional control of the inflammatory response.** *Nature Reviews Immunology*. Vol. 9. n.º 10 (2009). pp. 692-703. 1474-1733
- MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY, Charles A - **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.** *cell*. Vol. 91. n.º 3 (1997). pp. 295-298. 0092-8674
- MELLOU, F; LAZARI, D; SKAL TSA, H[et al.] - **Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and**

- antimicrobial activity.** *Journal of Biotechnology.* Vol. 116. n.º 3 (2005). pp. 295-304. 0168-1656
- MELNIKOVA, Irena - **Future of COX2 inhibitors.** *Nature Reviews Drug Discovery.* Vol. 4. n.º 6 (2005). pp. 453-454. 1474-1776
- MENDES-JUNIOR, Leônidas das Graças; MONTEIRO, Matheus Morais de Oliveira; CARVALHO, Alynne dos Santos[et al.] - **Oral supplementation with the rutin improves cardiovascular baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats.** *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism.* Vol. 38. n.º 11 (2013). pp. 1099-1106. 1715-5312
- MONTANARI, Carlos Alberto; BOLZANI, Vanderlan da S - **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais.** *Quím Nova.* Vol. 24. (2001). pp. 105-111.
- MOORE, Ben D; ANDREW, Rose L; KÜLHEIM, Carsten[et al.] - **Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context.** *New Phytologist.* Vol. 201. n.º 3 (2014). pp. 733-750. 1469-8137
- MUIR, Shelagh R; COLLINS, Geoff J; ROBINSON, Susan[et al.] - **Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols.** *Nature biotechnology.* Vol. 19. n.º 5 (2001). pp. 470-474. 1087-0156
- MURSU, Jaakko; VOUTILAINEN, Sari; NURMI, Tarja[et al.] - **Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study.** *British journal of nutrition.* Vol. 100. n.º 04 (2008). pp. 890-895. 1475-2662
- NAFEES, Sana; RASHID, Summya; ALI, Nemat[et al.] - **Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway.** *Chemico-biological interactions.* Vol. 231. (2015). pp. 98-107. 0009-2797
- NAM, Nguyen-Hai - **Naturally occurring NF-κB inhibitors.** *Mini reviews in medicinal chemistry.* Vol. 6. n.º 8 (2006). pp. 945-951. 1389-5575
- NATHAN, Carl - **Points of control in inflammation.** *Nature.* Vol. 420. n.º 6917 (2002). pp. 846-852. 0028-0836
- NGUYEN, MA; STAUBACH, P; TAMAI, I[et al.] - **High-dose short-term administration of naringin did not alter talinolol pharmacokinetics in humans.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* Vol. 68. (2015). pp. 36-42. 0928-0987
- NORRIS, Paul C; REICHART, Donna; DUMLAO, Darren S[et al.] - **Specificity of eicosanoid production depends on the TLR-4-stimulated macrophage phenotype.** *Journal of leukocyte biology.* Vol. 90. n.º 3 (2011). pp. 563-574. 0741-5400
- O'HAGAN, David; ZAIDI, Naveed A - **The resolution of tertiary α-acetylene-acetate esters by the lipase from *Candida cylindracea*.** *Tetrahedron: Asymmetry.* Vol. 5. n.º 6 (1994). pp. 1111-1118. 0957-4166
- OLIVEIRA, Luciana Gonzaga de; MANTOVANI, Simone Moraes - **Transformações biológicas: contribuições e perspectivas.** *Química Nova.* (2009). 0100-4042
- OLIVEIRA, VM; CARRARO, E; AULER, ME[et al.] - **Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp.** *Brazilian Journal of Biology.* n.º AHEAD (2016). pp. 0-0. 1519-6984

- OLTHOF, Margreet R; HOLLMAN, Peter CH; VREE, Tom B[et al.] - **Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans.** *The Journal of nutrition.* Vol. 130. n.º 5 (2000). pp. 1200-1203. 0022-3166
- OSTROV, Barbara E - **Immunotherapeutic biologic agents in autoimmune and autoinflammatory diseases.** *Immunological investigations.* Vol. 44. n.º 8 (2015). pp. 777-802. 0882-0139
- PACHECO, Francisco; CARDOSO, Elsa - Imunidade Inata e Inflamação. Em (AROSA, F., CARDOSO, E. & PACHECO, F.) **Fundamentos de Imunologia.** Lisboa, Portugal: LIDEL, 2012. 978-972-757-856-6
- PAGE, BRIGITTE; PAGE, MICHEL; NOEL, CHRISTIANE - **A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro.** *International journal of oncology.* Vol. 3. n.º 3 (1993). pp. 473-476. 1019-6439
- PASSOS, Carlos Luan Alves; FERREIRA, Christian; SOARES, Deivid Costa[et al.] - **Leishmanicidal Effect of Synthetic trans-Resveratrol Analogs.** *PloS one.* Vol. 10. n.º 10 (2015). p. e0141778. 1932-6203
- PENG, Wei; QIN, Rongxin; LI, Xiaoli[et al.] - **Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc.: a review.** *Journal of ethnopharmacology.* Vol. 148. n.º 3 (2013). pp. 729-745. 0378-8741
- PERK, Aliye Aras; SHATYNSKA-MYTSYK, Iryna; GERÇEK, Yusuf Can[et al.] - **Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells.** *Cancer cell international.* Vol. 14. n.º 1 (2014). p. 1. 1475-2867
- PERRETTI, Mauro - **The resolution of inflammation: New mechanisms in pathophysiology open opportunities for pharmacology.** In: Seminars in immunology, 2015,
- PICHERSKY, Eran; GANG, David R - **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective.** *Trends in plant science.* Vol. 5. n.º 10 (2000). pp. 439-445. 1360-1385
- POETKER, David M; REH, Douglas D - **A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids.** *Otolaryngologic Clinics of North America.* Vol. 43. n.º 4 (2010). pp. 753-768. 0030-6665
- POLLARD, David J; WOODLEY, John M - **Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now.** *TRENDS in Biotechnology.* Vol. 25. n.º 2 (2007). pp. 66-73. 0167-7799
- PRADO, Alexandre GS - **Química verde, os desafios da química do novo milênio.** *Química Nova.* Vol. 26. n.º 5 (2003). pp. 738-744. 0100-4042
- PROCHÁZKOVÁ, D; BOUŠOVÁ, I; WILHELMOVÁ, N - **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.** *Fitoterapia.* Vol. 82. n.º 4 (2011). pp. 513-523. 0367-326X
- PROENÇA DA CUNHA, AORR; ROQUE, OR - **Obtenção de moléculas com actividade farmacológica a partir de material vegetal e sua transformação em medicamento.** *Farmacognosia e Fitoquímica.* Lisboa: CALOUSTE GULBENKIAN. Vol. 1. (2009). p. 670.
- PUBCHEM - **PubChem.** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>: 2016.

- QUIDEAU, Stéphane; DEFFIEUX, Denis; DOUAT-CASASSUS, Celine[et al.] - **Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis.** *Angewandte Chemie International Edition*. Vol. 50. n.º 3 (2011). pp. 586-621. 1521-3773
- RADKAR, Vijayalaxmi; LAU-CAM, Cesar; HARDEJ, Diane[et al.] - **The role of surface receptor stimulation on the cytotoxicity of resveratrol to macrophages.** *Food and chemical toxicology*. Vol. 46. n.º 12 (2008). pp. 3664-3670. 0278-6915
- RATES, Stela Maria Kuze - **Plants as source of drugs.** *Toxicon*. Vol. 39. n.º 5 (2001). pp. 603-613. 0041-0101
- RAVAGNAN, Giampietro; DE FILIPPIS, Anna; CARTENI, Maria[et al.] - **Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces β -defensin production and reduces inflammatory response.** *Inflammation*. Vol. 36. n.º 1 (2013). pp. 26-34. 0360-3997
- REBELLO, Sam; ZHAO, Sally; HARIRY, Sam[et al.] - **Intestinal OATP1A2 inhibition as a potential mechanism for the effect of grapefruit juice on aliskiren pharmacokinetics in healthy subjects.** *European journal of clinical pharmacology*. Vol. 68. n.º 5 (2012). pp. 697-708. 0031-6970
- REETZ, Manfred T - **Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future.** *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 135. n.º 34 (2013). pp. 12480-12496. 0002-7863
- REGEV-SHOSHANI, Gilly; SHOSEYOV, Oded; BILKIS, Itzhak[et al.] - **Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation.** *Biochemical Journal*. Vol. 374. n.º 1 (2003). pp. 157-163. 0264-6021
- REINISALO, Mika; KÄRLUND, Anna; KOSKELA, Ali[et al.] - **Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases.** *Oxidative medicine and cellular longevity*. (2015). 1942-0900
- REIS, Pedro; HOLMBERG, Krister; WATZKE, Heribert[et al.] - **Lipases at interfaces: a review.** *Advances in colloid and interface science*. Vol. 147. (2009). pp. 237-250. 0001-8686
- REN, Xiaolin; SHI, Yuling; ZHAO, Di[et al.] - **Naringin protects ultraviolet B-induced skin damage by regulating p38 MAPK signal pathway.** *Journal of Dermatological Science*. (2015). 0923-1811
- RENAUD, S de; DE LORGERIL, Michel - **Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.** *The Lancet*. Vol. 339. n.º 8808 (1992). pp. 1523-1526. 0140-6736
- RIBEIRO, Bernardo Dias; CASTRO, Aline Machado de; COELHO, Maria Alice Zarur[et al.] - **Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production.** *Enzyme research*. Vol. 2011. (2011).
- RIBEIRO, Daniela; FREITAS, Marisa; LIMA, José LFC[et al.] - **Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids.** *Medicinal research reviews*. Vol. 35. n.º 5 (2015). pp. 877-936. 1098-1128
- RICE-ÉVANS, Catherine - **Flavonoid antioxidants.** *Current medicinal chemistry*. Vol. 8. n.º 7 (2001). pp. 797-807. 0929-8673

- RIVIÈRE, Céline; PAWLUS, Alison D; MÉRILLON, Jean-Michel - **Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae.** *Natural product reports.* Vol. 29. n.º 11 (2012). pp. 1317-1333.
- ROBERTI, Marinella; PIZZIRANI, Daniela; SIMONI, Daniele[et al.] - **Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as apoptosis-inducing agents.** *Journal of medicinal chemistry.* Vol. 46. n.º 16 (2003). pp. 3546-3554. 0022-2623
- ROCK, Kenneth L; LATZ, Eicke; ONTIVEROS, Fernando[et al.] - **The sterile inflammatory response.** *Annual review of immunology.* Vol. 28. (2010). p. 321.
- ROUPE, Kathryn A; REMSBERG, Connie M; YÁÑEZ, Jaime A[et al.] - **Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic.** *Current clinical pharmacology.* Vol. 1. n.º 1 (2006). pp. 81-101. 1574-8847
- RYU, Geonseek; JU, Jeung Hoon; PARK, Yong Ju[et al.] - **The radical scavenging effects of stilbene glucosides from Polygonum multiflorum.** *Archives of pharmacal research.* Vol. 25. n.º 5 (2002). pp. 636-639. 0253-6269
- SAHU, Bidya Dhar; TATIREDDY, Srujana; KONERU, Meghana[et al.] - **Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection.** *Toxicology and applied pharmacology.* Vol. 277. n.º 1 (2014). pp. 8-20. 0041-008X
- SALEM, Jamila Hadj; CHEVALOT, Isabelle; HARSCOAT-SCHIAVO, Christelle[et al.] - **Biological activities of flavonoids from Nitraria retusa (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives.** *Food Chemistry.* Vol. 124. n.º 2 (2011). pp. 486-494. 0308-8146
- SALIHU, Aliyu; ALAM, Md Zahangir - **Solvent tolerant lipases: a review.** *Process Biochemistry.* Vol. 50. n.º 1 (2015). pp. 86-96. 1359-5113
- SALUM, Lívia de Barros - **Estudos *in silico* no planejamento de candidatos a novos fármacos na terapia do câncer de mama e de reposição hormonal.** São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, Área de concentração: Física Biomolecular, 2007. Mestrado
- SANTOS, Everton OL; KABEYA, Luciana M; FIGUEIREDO-RINHEL, Andrea SG[et al.] - **Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis.** *International immunopharmacology.* Vol. 21. n.º 1 (2014). pp. 102-111. 1567-5769
- SCHIMMER, BP; PARKER, KL - **Hormônio adrenocorticotrófico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais.** *Goodman & Gilman's: as bases farmacológicas da terapêutica. 9a ed.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill. (2006). pp. 1082-1102.
- SCHMID, Rolf D; VERGER, Robert - **Lipases: interfacial enzymes with attractive applications.** *Angewandte Chemie International Edition.* Vol. 37. n.º 12 (1998). pp. 1608-1633. 1521-3773

- SCHWARTZ, Joel L; BAKER, Vikki; LARIOS, Eric[et al.] - **Molecular and cellular effects of green tea on oral cells of smokers: a pilot study.** *Molecular nutrition & food research.* Vol. 49. n.º 1 (2005). pp. 43-51. 1613-4133
- SEIGLER, David S - **Primary roles for secondary compounds.** *Biochemical Systematics and Ecology.* Vol. 5. n.º 3 (1977). pp. 195-199. 0305-1978
- SEMEDO, Edmilson António Borges - **Semi-síntese de novos derivados flavonóides bioativos.** Coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia 2015. 128. Mestrado
- SENDER, Vicky; STAMME, Cordula - **Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization.** *Communicative & integrative biology.* Vol. 7. n.º 4 (2014). p. e29053. 1942-0889
- SHARMA, Shrestha; ALI, Asgar; ALI, Javed[et al.] - **Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery.** *Expert opinion on investigational drugs.* Vol. 22. n.º 8 (2013). pp. 1063-1079. 1354-3784
- SHEN, Shing-Chuan; LEE, Woan-Ruoh; LIN, Hui-Yi[et al.] - **In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E 2 production.** *European journal of pharmacology.* Vol. 446. n.º 1 (2002). pp. 187-194. 0014-2999
- SHEN, Tao; WANG, Xiao-Ning; LOU, Hong-Xiang - **Natural stilbenes: an overview.** *Natural product reports.* Vol. 26. n.º 7 (2009). pp. 916-935.
- SHIYU, Shu; ZHIYU, Ling; MAO, Ye[et al.] - **Polydatin up-regulates Clara cell secretory protein to suppress phospholipase A2 of lung induced by LPS in vivo and in vitro.** *BMC cell biology.* Vol. 12. n.º 1 (2011). p. 1. 1471-2121
- SIEMANN, EH; CREAMY, LL - **Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine.** *American Journal of Enology and Viticulture.* Vol. 43. n.º 1 (1992). pp. 49-52. 0002-9254
- SINGH, Devendra; SM RAWAT, M; SEMALTY, Ajay[et al.] - **Rutin-phospholipid complex: an innovative technique in novel drug delivery system-NDDS.** *Current drug delivery.* Vol. 9. n.º 3 (2012). pp. 305-314. 1567-2018
- SIREROL, J Antoni; RODRÍGUEZ, María L; MENA, Salvador[et al.] - **Role of Natural Stilbenes in the Prevention of Cancer.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Vol. 2016. (2015). 1942-0900
- SOARES, Deivid C; PORTELLA, Nathalya A; RAMOS, Mônica Freiman de S[et al.] - **Trans-β-Caryophyllene: An Effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (Copaifera spp.).** *Evidence-based complementary and alternative medicine.* Vol. 2013. (2013). 1741-427X
- SOARES, Deivid Costa; CALEGARI-SILVA, Teresa C; LOPES, Ulisses G[et al.] - **Dolabelladienetriol, a compound from Dictyota paffii algae, inhibits the infection by Leishmania amazonensis.** *PLoS Negl Trop Dis.* Vol. 6. n.º 9 (2012). p. e1787. 1935-2735
- SOROKIN, Andrey - **Glomerulonephritis and Cellular Regulation of Prostaglandin Synthesis.** INTECH Open Access Publisher, 2011. 9533073888
- STAUCH, Benjamin; FISHER, Stuart J; CIANCI, Michele - **Open and closed states of Candida antarctica lipase B: protonation and the mechanism of interfacial**

- activation.** *Journal of lipid research.* Vol. 56. n.º 12 (2015). pp. 2348-2358. 0022-2275
- STEPANKOVA, Veronika; BIDMANOVA, Sarka; KOUDELAKOVA, Tana[et al.] - **Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents.** *Acs Catalysis.* Vol. 3. n.º 12 (2013). pp. 2823-2836. 2155-5435
- STERGIOU, Panagiota-Yiolanda; FOUKIS, Athanasios; FILIPPOU, Michalis[et al.] - **Advances in lipase-catalyzed esterification reactions.** *Biotechnology advances.* Vol. 31. n.º 8 (2013). pp. 1846-1859. 0734-9750
- STUART, Lynda M; EZEKOWITZ, R Alan - **Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly.** *Nature Reviews Immunology.* Vol. 8. n.º 2 (2008). pp. 131-141. 1474-1733
- SU, Dan; CHENG, Ying; LIU, Miao[et al.] - **Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities in vitro.** *PloS one.* Vol. 8. n.º 1 (2013). p. e54505. 1932-6203
- SUDAN, Sudhanshu; RUPASINGHE, HP Vasantha - **Antiproliferative activity of long chain acylated esters of quercetin-3-O-glucoside in hepatocellular carcinoma HepG2 cells.** *Experimental Biology and Medicine.* (2015). p. 1535370215570828. 1535-3702
- TAK, Paul P; FIRESTEIN, Gary S - **NF-κB: a key role in inflammatory diseases.** *The Journal of clinical investigation.* Vol. 107. n.º 1 (2001). pp. 7-11. 0021-9738
- TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo - **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell.* Vol. 140. n.º 6 (2010). pp. 805-820. 0092-8674
- TAO, Junhua; XU, Jian-He - **Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes.** *Current opinion in chemical biology.* Vol. 13. n.º 1 (2009). pp. 43-50. 1367-5931
- TAYAL, Vandana; KALRA, Bhupinder Singh - **Cytokines and anti-cytokines as therapeutics—an update.** *European journal of pharmacology.* Vol. 579. n.º 1 (2008). pp. 1-12. 0014-2999
- TKALCEVIC, Josephine; NOVELLI, Marco; PHYLACTIDES, Marios[et al.] - **Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G.** *Immunity.* Vol. 12. n.º 2 (2000). pp. 201-210. 1074-7613
- TOLOMEO, Manlio; GRIMAUDDO, Stefania; DI CRISTINA, Antonietta[et al.] - **Pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells.** *The international journal of biochemistry & cell biology.* Vol. 37. n.º 8 (2005). pp. 1709-1726. 1357-2725
- TORRELO, Guzman; HANEFELD, Ulf; HOLLMANN, Frank - **Biocatalysis.** *Catalysis Letters.* Vol. 145. n.º 1 (2015). pp. 309-345. 1011-372X
- TRACEY, Kevin J - **The inflammatory reflex.** *Nature.* Vol. 420. n.º 6917 (2002). pp. 853-859. 0028-0836
- TURINI, Marco E; DUBOIS, Raymond N - **Cyclooxygenase-2: a therapeutic target.** *Annual review of medicine.* Vol. 53. n.º 1 (2002). pp. 35-57. 0066-4219
- UMAR, Sadiq; MISHRA, Navin Kumar; PAL, Kaushal[et al.] - **Protective effect of rutin in attenuation of collagen-induced arthritis in Wistar rat by inhibiting**

- inflammation and oxidative stress.** *Indian Journal of Rheumatology.* Vol. 7. n.º 4 (2012). pp. 191-198. 0973-3698
- URLACHER, Vlada B; SCHMID, Rolf D - **Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations.** *Current opinion in chemical biology.* Vol. 10. n.º 2 (2006). pp. 156-161. 1367-5931
- VANE, John Robert - **Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.** *Nature.* Vol. 231. n.º 25 (1971). pp. 232-235. 0028-0836
- VAZQUEZ-TORRES, Andrés; FANG, Ferric C - **Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages.** *Trends in microbiology.* Vol. 9. n.º 1 (2001). pp. 29-33. 0966-842X
- VERPOORTE, Robert - **Metabolic engineering of plant secondary metabolism.** Springer Science & Business Media, 2000. 0792363604
- VISKUPIČOVÁ, J; ONDREJOVIČ, M; ŠTURDÍK, E - **The potential and practical applications of acylated flavonoids.** *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences.* Vol. 64. n.º 6 (2009). pp. 355-360. 0031-7144
- VISKUPICOVA, Jana; DANIHELOVA, Martina; ONDREJOVIC, Miroslav[et al.] - **Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods.** *Food Chemistry.* Vol. 123. n.º 1 (2010). pp. 45-50. 0308-8146
- WADSWORTH, Teri L; KOOP, Dennis R - **Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages.** *Biochemical pharmacology.* Vol. 57. n.º 8 (1999). pp. 941-949. 0006-2952
- WAFFO-TÉGUO, Pierre; HAWTHORNE, Michael E; CUENDET, Muriel[et al.] - **Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures.** *Nutrition and cancer.* Vol. 40. n.º 2 (2001). pp. 173-179. 0163-5581
- WALLE, Thomas - **Absorption and metabolism of flavonoids.** *Free Radical Biology and Medicine.* Vol. 36. n.º 7 (2004). pp. 829-837. 0891-5849
- WANG, Hui-Lin; GAO, Jian-Ping; HAN, Yu-Liang[et al.] - **Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo.** *Phytomedicine.* Vol. 22. n.º 5 (2015). pp. 553-559. 0944-7113
- WANG, Xingmin; SONG, Rui; CHEN, Yunyan[et al.] - **Polydatin—a new mitochondria protector for acute severe hemorrhagic shock treatment.** *Expert opinion on investigational drugs.* Vol. 22. n.º 2 (2013). pp. 169-179. 1354-3784
- WANG, Yu; XUE, Jian; SUN, XD[et al.] - **Study on decreasing effects of polydatin on blood viscosity in the rat model of acute blood stasis.** *China Pharm.* Vol. 15. (2004). pp. 275-7.
- WANI, A; AMLESH, S; SARWAT, S - **Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFjB, TNF-a and caspase-3 expression in wistar rats.** *Food Chem Toxicol.* Vol. 49. (2011). pp. 2013-21.
- WILCOX, Lisa J; BORRADAILE, Nica M; HUFF, Murray W - **Antiatherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid.** *Cardiovascular Drug Reviews.* Vol. 17. n.º 2 (1999). pp. 160-178. 1527-3466

- WILLCOX, Joye K; ASH, Sarah L; CATIGNANI, George L - **Antioxidants and prevention of chronic disease**. *Critical reviews in food science and nutrition*. Vol. 44. n.º 4 (2004). pp. 275-295. 1040-8398
- WU, Min; LIU, Meixia; GUO, Gang[et al.] - **Polydatin Inhibits Formation of Macrophage-Derived Foam Cells**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 501. (2015a). p. 729017.
- WU, Yang; XUE, Lai; DU, Weimin[et al.] - **Polydatin Restores Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Aorta Rings Impaired by High Glucose: A Novel Insight into the PPAR β -NO Signaling Pathway**. *PLoS one*. Vol. 10. n.º 5 (2015b). p. e0126249. 1932-6203
- XIAO, Jianbo - **Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance?** *Critical reviews in food science and nutrition*. n.º just-accepted (2015). pp. 00-00. 1040-8398
- XIAO, Jianbo; CHEN, Tingting; CAO, Hui - **Flavonoid glycosylation and biological benefits**. *Biotechnol Adv*. Vol. 14. n.º 9 (2014a).
- XIAO, Jianbo; MUZASHVILI, Tamar S; GEORGIEV, Milen I - **Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids**. *Biotechnology advances*. Vol. 32. n.º 6 (2014b). pp. 1145-1156. 0734-9750
- XIE, Xi; PENG, Jing; HUANG, Kaipeng[et al.] - **Polydatin ameliorates experimental diabetes-induced fibronectin through inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway in rat glomerular mesangial cells**. *Molecular and cellular endocrinology*. Vol. 362. n.º 1 (2012). pp. 183-193. 0303-7207
- YANG, Kui; WANG, Ya-Jane - **Lipase-catalyzed cellulose acetylation in aqueous and organic media**. *Biotechnology progress*. Vol. 19. n.º 6 (2003). pp. 1664-1671. 1520-6033
- YAO, Jun; WANG, Jian-Yao; LIU, Lei[et al.] - **Polydatin ameliorates DSS-induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor-kappaB activation**. *Planta medica*. Vol. 77. n.º 5 (2011). pp. 421-427. 0032-0943
- YEH, Chung-Hsin; YANG, Jiann-Jou; YANG, Ming-Ling[et al.] - **Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF- κ B pathway**. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 69. (2014). pp. 249-257. 0891-5849
- ZAIA, Dimas AM; ZAIA, CTBV; LICHTIG, Jaim - **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes**. *Química nova*. Vol. 21. n.º 6 (1998). pp. 787-793.
- ZENG, Zhenhua; CHEN, Zhongqing; LI, Tao[et al.] - **Polydatin: a new therapeutic agent against multiorgan dysfunction**. *Journal of surgical research*. Vol. 198. n.º 1 (2015). pp. 192-199. 0022-4804
- ZHANG, Jingze; GAO, Wenyuan; HU, Xiao[et al.] - **The influence of compatibility of traditional Chinese medicine on the pharmacokinetic of main components in Fructus aurantii**. *Journal of ethnopharmacology*. Vol. 144. n.º 2 (2012). pp. 277-283. 0378-8741
- ZHAO, Yunpeng; LI, Zhong; WANG, Wenhan[et al.] - **Naringin Protects Against Cartilage Destruction in Osteoarthritis Through Repression of NF- κ B Signaling Pathway**. *Inflammation*. (2015). pp. 1-8. 0360-3997

- ZHENG, Li-Fang; WEI, Qing-Yi; CAI, Yu-Jun[et al.] - **DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: mechanism and structure-activity relationship.** *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 41. n.º 12 (2006). pp. 1807-1816. 0891-5849
- ZHOU, Maojin; CHEN, Xiaoyan; ZHONG, Dafang - **Simultaneous determination of trans-resveratrol-3-O-glucoside and its two metabolites in rat plasma using liquid chromatography with ultraviolet detection.** *Journal of Chromatography B*. Vol. 854. n.º 1 (2007). pp. 219-223. 1570-0232