

Síntese, caracterização e estudo das propriedades cromáticas de novos derivados lipofílicos de antocianinas monoglucósidas



Marta Guimarães

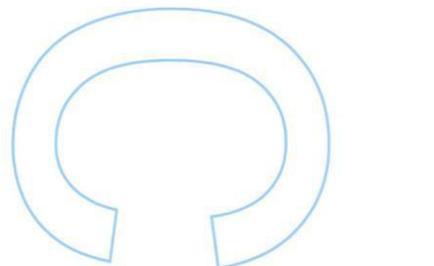
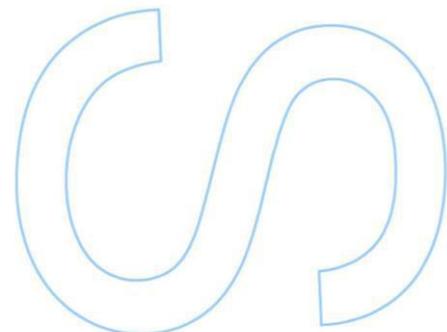
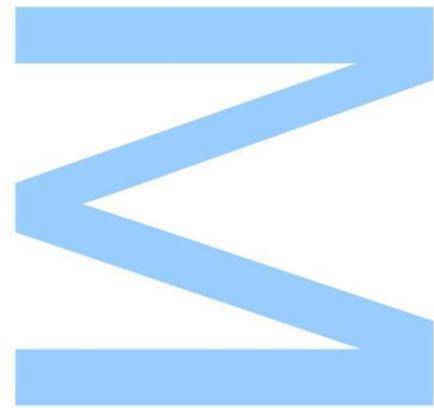
Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica
2018

Orientador

Luís Cruz, Investigador Pós-doc, Faculdade de Ciências

Coorientador

Victor de Freitas, Professor Catedrático, Faculdade de Ciências

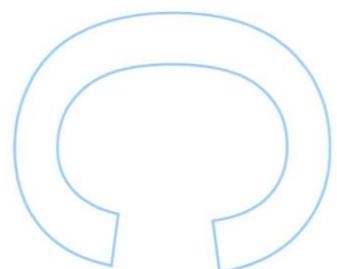
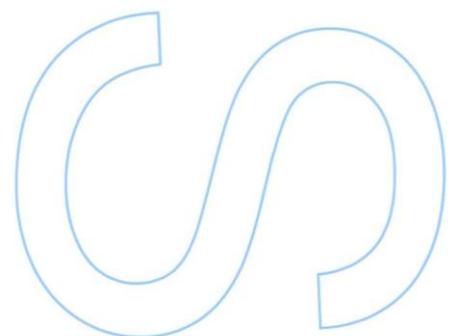
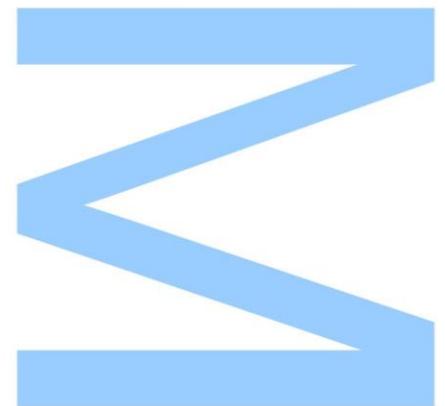


Todas as correções
determinadas pelo júri, e só essas,
foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto,

____/____/____



Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e apoio de várias pessoas e instituições. Deste modo, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho:

Em primeiro lugar, ao Doutor Luís Cruz, o meu orientador, pelo apoio laboratorial, pelos conhecimentos partilhados, pela paciência e, mais importante, por me ensinar que o caminho com mais obstáculos não é o mais simples de percorrer, mas é com certeza o mais gratificante.

Ao Professor Victor de Freitas, coorientador deste trabalho, pela confiança depositada em mim e dinamismo, necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Nuno Mateus pelo apoio, ideias e disponibilidade total, sempre com boa disposição.

À Rosa e ao Carlos, sempre incansáveis, pela colaboração sempre disponível e por todo o apoio e conhecimento em proteínas que partilharam.

À Sílvia, e à Doutora Zélia pela assistência durante as análises de espectrometria de massa.

À Mariana por todas as análises de RMN que realizou, indispensáveis para esta tese.

A todas as pessoas que trabalham no laboratório de Química Orgânica por terem tornado os dias alegres e mais leves. Em especial aos meus colegas de laboratório: Paulinha, Hélder, Elsa, Susana, Ricardo, Iva, Sónia, Ana Gomes, Vânia, Cátia, Telmo, Ana Luísa, Natércia, Joana Azevedo, Joana Oliveira, Joana Moreira, Ana Reis, e Sofia. Pelas horas de almoço sempre bem-dispostas, pelos cafés e doces e pela disponibilidade total, pois aprendi algo com cada um.

Aos meus pais por tudo o que sacrificaram por mim, sem eles não chegaria tão longe, por me ensinarem a não desistir, nos momentos mais negativos, pois com empenho e dedicação oportunidades surgirão. Ao meu irmão, por me ensinar que mais importante que ter uma profissão é ter uma paixão por aquilo que fazemos. Aos meus avós, Alice e Jacinto, por fazerem de mim quem sou. Pela educação que me deram e pelo apoio às minhas escolhas. Por me lembrarem que devemos dedicar-nos completamente em tudo, no trabalho, na família e na amizade, sem arrependimentos.

À Faculdade Nova de Lisboa, FCT, nomeadamente ao grupo do Professor João Crespo, por me terem acolhido durante o breve período em que realizei experiências em Lisboa. À Doutora Carla Portugal por todo conhecimento fornecido, pela paciência e disponibilidade. À Doutora Cláudia Galinha pelo apoio e colaboração, sempre disponível e com boa disposição.

Finalmente, mas não menos importante, gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências, especialmente a todos os elementos do Departamento de Química e Bioquímica que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Este trabalho encontra-se inserido no projeto de investigação ANTHO4SKIN, financiado pela FCT (PTDC/AGR-TEC/3078/2014) através do acordo PT2020 (UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/FEDER/007265).

Lista de Publicações

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e integra resultados que foram publicados em congressos científicos através de comunicações em painel, comunicações orais e em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Cruz L., Guimarães M., Araújo P., Évora A., de Freitas V., Mateus N. (2017) Malvidin-3-glucoside-fatty acid conjugates: from hydrophilic towards lipophilic derivatives. *J. Agric. Food Chem*, Volume 65, Issue 31, pg: 6513-6518. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05461.

Mendoza J., Pina F., Basílio N., Guimarães M., de Freitas V., Cruz L. (2018) Extending the stability of red and blue colors of malvidin-3-glucoside-lipophilic derivatives in the presence of SDS micelles. *Dyes and Pigments*, Volume 151, pg: 321-326. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.01.007.

Guimarães M., Mateus N., de Freitas V., Cruz L. (2018) Improvement of color stability of cyanidin-3-glucoside by fatty acid enzymatic acylation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 66, Issue 38, pg 10003-10010. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03536.

Comunicações Orais:

Cruz L., Guimarães M., Araújo P., Évora A., de Freitas V., Mateus N. (2016) Malvidin-3-glucoside-fatty acid conjugates: from Hydrophilic towards novel lipophilic derivatives. 28th International Conference on Polyphenols, Vienna, Austria.

Évora A., Fernandes I., Guimarães M., Cruz L., de Freitas V., Mateus N. (2017) New anthocyanin derivatives for technological applications in the cosmetic industry. IJUP - Investigação Jovem na Universidade do Porto.

Mateus N., Fernandes I., Cruz L., Évora A., Guimarães M., de Freitas V. (2017) ANTHO4SKIN – Recycling anthocyanins to produce anthocyanin derivatives for cosmetic applications. 21st Annual Green Chemistry & Engineering Conference, Portland, Oregon, USA.

Guimarães M., Mateus N. de Freitas V., Cruz L. (2017) Color stability of oil-soluble cyanidin-3-glucoside dyes. 10^o Encontro Nacional de Cromatografia, Bragança, Portugal.

Cruz L., Mendoza J., Pina F., Basílio N., Guimarães M., de Freitas V. (2018) Extending the blue color stabilization of anthocyanin derivatives. 29th International Conference on Polyphenols and 9th Tannin Conference. Wisconsin, Chicago, USA.

Comunicações em Pannel:

Guimarães M., Mateus N., de Freitas V., Cruz L. (2016) Lipophilicity parameters and antioxidant features of malvidin-3-glucoside-fatty acid derivatives. 13^o Encontro Nacional de Química dos Alimentos, Porto, Portugal.

Fernandes I., Évora A., Guimarães M., Cruz L., de Freitas V., Mateus N. (2016) New anthocyanin derivatives for technological applications in the cosmetic industry. 22^o Encontro Luso-Galego de Química; Bragança, Portugal.

Guimarães M., Araújo P., Évora A., Mateus N., de Freitas V., Cruz L. (2017) Lipophilicity enhancement of anthocyanin-3-monoglucosides bioactives for cosmetic applications. IJUP – Investigação Jovem na Universidade do Porto.

Évora A., Fernandes I., Moreira L., Cruz L., Guimarães M., de Freitas V., Mateus N. (2017). New anthocyanin derivatives for application in cosmetics. XXV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa, Portugal.

Resumo

Este trabalho pretende estudar as características de novos derivados de origem antociânica, de modo a explorar a sua aplicação em matrizes lipofílicas, presentes nos produtos alimentares e formulações cosméticas. As antocianinas são polifenóis hidrossolúveis responsáveis pelas cores atrativas dos frutos, vegetais e flores. Esta classe de polifenóis possui, para além da sua elevada capacidade de coloração, diversas propriedades biológicas, como, elevado poder antioxidante, e propriedades anti proliferativas e antimicrobianas, entre outras. Os novos derivados foram sintetizados através da acilação enzimática de duas antocianinas monoglucósidas; malvidina-3-glucósido (Mv3glc) e cianidina-3-glucósido (Cy3glc), com diferentes ácidos gordos monoinsaturados.

A estrutura dos derivados sintetizados foi analisada por espetrometria de massa, comprovando a ligação entre a cadeia carbonada e o açúcar da antocianina. Através da análise RMN do derivado Cy3glc-C12 identificou-se a ligação covalente entre o carbono primário do açúcar e a cadeia carbonada do ácido gordo. A adição do ácido gordo aumentou a solubilidade destes derivados em matrizes lipídicas, comparativamente com os seus precursores. Através de ensaios de lipofilicidade foi possível observar uma relação linear entre o aumento da lipofilicidade e o aumento do tamanho da cadeia carbonada fornecida pelo ácido gordo.

A estabilidade química dos derivados lipofílicos de Cy3glc foi analisada num tensoativo (SDS), no intervalo de pH de 3 a 7. Todos os derivados lipofílicos evidenciaram maior estabilidade cromática do que a Cy3glc. Entre o pH 3-5 os derivados lipofílicos continham mais catião flavílio (90 %) do que a Cy3glc (70 %). A pH neutro, Cy3glc-C10, o derivado lipofílico mais estável, apresentava tons azuis-violeta, devido à base quinoidal (50 %), enquanto que a Cy3glc, sofreu descoloração devido à presença da espécie predominante chalcona-*trans*. Através da determinação dos parâmetros da degradação térmica, foi possível confirmar a estabilidade superior da cor dos derivados, uma vez que todos possuíam tempos de semi-vida superiores e constantes cinéticas inferiores, comparativamente às da Cy3glc. A influência da cadeia carbonada no poder antioxidante nos derivados de Mv3glc foi ainda analisada, observando-se um aumento desta característica para os compostos esterificados com uma cadeia carbonada até oito carbonos.

Numa última fase, foi desenvolvido um novo método de síntese dos derivados lipofílicos, por imobilização da enzima. A influência da imobilização da enzima foi estudada através da síntese da Cy3glc-C8, observando-se um aumento de formação do pigmento, ocorrendo mais depressa, comparativamente às reações com a enzima não modificada. A

eficiência da imobilização da enzima foi também analisada através da sua capacidade de reutilização. A capacidade de reutilização da enzima imobilizada foi estudada através da análise da síntese de Cy3glc-C8 num processo contínuo, num reator de membranas, obtendo produtos com rendimentos semelhantes, comprovando que a enzima que ficou retida no suporte não se libertou.

Palavras-Chave:

Antocianinas, acilação enzimática, derivados lipofílicos, antioxidante, imobilização de enzimas.

Abstract

The improvement of anthocyanins lipophilicity was performed, by enzymatic acylation, to expand the technological application of these pigments in lipid-based foods and cosmetic formulations. Anthocyanins are water-soluble polyphenols, responsible for the attractive colors of many fruits, flowers and vegetables. These pigments have gained the interest of the industry and researchers alike due to their high pigmentation capacity and interesting bioactivity abilities, such as high antioxidant activity, and anti-microbial and anti-proliferative properties.

The new compounds were synthesized by modifying two anthocyanins (Cy3glc and Mv3glc), esterified with monounsaturated fatty acids with variable chain length. The chemical structure of the new compounds was analyzed, by mass spectrometry, identifying a covalent bond between the sugar residue of the anthocyanin and the different fatty acid chain length. The NMR analysis of Cy3glc-C12 confirmed the bond of the anthocyanin's sugar residue and the fatty acid and identified that the bond occurs in the primary carbon of the sugar. The liposolubility of the new derivatives was assessed, with the new derivatives possessing superior lipophilicity than of its precursors. Lipophilicity assays demonstrated a direct correlation between the increase of the fatty acid chain length and lipophilicity enhancement.

Color stability assays of the lipophilic derivatives were also performed in a lipidic media (SDS), at different pH's and their thermal degradation was analyzed. Overall, Cy3glc lipophilic derivatives showed an improved color stability and are less sensitive to thermal degradation than the non-modified Cy3glc between pH 3 and 7. At pH 3 and 5, the lipophilic derivatives possessed higher percentage of flavylium cation (90 %) than Cy3glc (70 %). At neutral pH, Cy3glc-C10 solutions exhibited blue-purple colors, due to the high presence of the neutral quinoidal base (50 %) whereas, *trans*-chalcone is the predominant species in Cy3glc solutions, possessing yellow colors. The determination of the kinetic and thermodynamic thermal degradation confirmed stability enhancement with the acylation modification, with Cy3glc-C10 being the most stable. Antioxidant activity studies demonstrated that up to 8 carbons, the fatty acid chain length enhances antioxidant activity.

The development of a different method of synthesis of lipophilic derivatives, by enzyme immobilization, was the final step in this work. The synthesis occurred in a membrane reactor, with previously immobilized enzyme. Enzyme immobilization on membranes showed an increase in the enzymatic activity, by obtaining higher Cy3glc-C8 yield in the membrane reactor than when using the non-modified enzyme. The efficiency of the immobilization was also studied by analyzing its recycling capacity. Recycling capacity was observed by the synthesis of Cy3glc-C8 in a continuous flow process, where the yields

of product formation were similar, therefore, proving that the amount of retained enzyme wasn't eluted.

Keywords:

Anthocyanins, enzymatic acylation, lipophilic derivatives, antioxidant, enzyme immobilization.

Índice

Agradecimentos	I
Lista de Publicações	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice	IX
Índice de Tabelas	XI
Índice de Figuras	XIII
Lista de Abreviaturas	XVII
I. <u>Introdução</u>	1
1. Introdução Geral	1
1.1. Compostos fenólicos	3
1.1.1. Flavonóides	4
1.2. Catalisadores enzimáticos.....	12
1.3. Imobilização de enzimas	16
1.4. Reatores de membranas.....	17
Objetivos.....	19
II. <u>Material e Métodos</u>	21
2. Material e Métodos.....	23
2.1. Reagentes.....	23
2.2. Técnicas cromatográficas e de análise estrutural.....	23
2.2.1. Cromatografia líquida de alta pressão, HPLC-DAD	23
2.2.2. Cromatografia de camada fina, TLC	24
2.2.3. Espetrometria de massa, LC-MS	24
2.2.4. Ressonância Magnética Nuclear, RMN	25
2.3. Obtenção dos extratos antociânicos e isolamento das antocianinas maioritárias .	25
2.4. Síntese e isolamento de derivados lipofílicos de antocianinas	26
2.5. Caracterização físico-química dos derivados	27
2.5.1. Parâmetros de lipofilicidade.....	27
2.6. Estabilidade da cor dos derivados de Cy3glc por efeito da temperatura e do pH .	28
2.6.1. Estudo cinético da degradação térmica	28
2.6.2. Determinação da constante de equilíbrio, pK'_a	29
2.7. Propriedades antioxidantes	29
2.7.1. Método de β -caroteno.....	29
2.7.2. Método de consumo de oxigénio	30
2.8. Processo biológico contínuo - reator de membrana	31

2.8.1.	Seleção de membranas como suporte enzimático.....	31
2.8.2.	Imobilização de enzima no suporte de membrana	32
2.8.3.	Determinação do perfil proteico	32
2.8.3.1.	Análise por eletroforese, SDS-PAGE	32
2.8.3.2.	Análise por MALDI-TOF	33
2.8.4.	Reações enzimáticas num reator de membranas	33
2.8.4.1.	Estudo comparativo da estabilidade da enzima.....	34
III.	<u>Resultados e Discussão</u>	35
3.1.	Obtenção de extratos de antocianinas	37
3.1.1.	Caracterização dos extratos por HPLC e LC-MS	37
3.1.2.	Síntese dos derivados lipofílicos da Mv3glc e da Cy3glc	39
3.2.	Caracterização estrutural dos derivados de Mv3glc e Cy3glc.....	45
3.2.1.	LC-MS/ESI.....	45
3.2.2.	Caraterização dos derivados por RMN	48
3.2.3.	Parâmetros de lipofilicidade	51
3.2.4.	Estudo cromático dos derivados lipofílicos sintetizados da Mv3glc e da Cy3glc	53
3.2.5.	Estudo cinético da degradação térmica	53
3.2.6.	Constante de acidez aparente, pK'_a	59
3.3.	Atividade antioxidante	60
3.4.	Reator de membranas.....	61
3.4.1.	Seleção de membranas para suporte enzimático	61
3.4.2.	Perfil proteico da amostra por MALDI-TOF e SDS-PAGE.....	63
3.4.3.	Estudo de variáveis de enzima e antocianina em bulk.....	64
3.4.4.	Imobilização do catalisador enzimático.....	65
3.4.5.	Ensaio de atividade enzimática - Síntese de Cy3glc-C8 num reator de membranas.....	66
IV.	<u>Conclusões</u>	72
	Conclusões e perspetivas futuras	74
	Referências bibliográficas.....	76

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. O paradoxo francês ¹⁸	3
Tabela 1.2. Concentração de antocianinas de diversas de fontes alimentares vegetais, como bebidas frutos e vegetais ⁴⁵	6
Tabela 3.1. Caraterização estrutural das antocianinas presentes no extrato de vinho e da amora.	38
Tabela 3.2. Estudo das varáveis da síntese enzimática de Cy3glc-C8	39
Tabela 3.3. Dados de espetrometria de UV-Vis, tempos de retenção de HPLC-DAD e rendimentos obtidos dos derivados lipofílicos e seus respetivos precursores.	45
Tabela 3.4. Fragmentações e tempos de retenção obtidos dos espectros de massa dos derivados acilados sintetizados e seus respetivos precursores	46
Tabela 3.5. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de Cy3glc-C12 em DMSO/TFA (9:1)	49
Tabela 3.6. Propriedades físico-químicas dos derivados lipofílicos e seus respetivos precursores referentes à lipofilicidade.....	53
Tabela 3.7. Parâmetros cinéticos da degradação térmica de Cy3glc (9) e seus derivados lipofílicos (10-14) em solução SDS aquosa.....	57
Tabela 3.8. Descrição de membranas assimétricas de ultrafiltração utilizadas na imobilização de CalB	62
Tabela 3.9. Ensaio de estudos de resistência de membranas a solventes orgânicos....	63
Tabela 3.10. Estudo das varáveis de enzima e antocianina em reações em bulk	64
Tabela 3.11. Capacidade de retenção da enzima CalB dependendo do tipo de membrana e pressão aplicada.....	66

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estrutura base dos compostos flavonóides (2-fenilbenzopirano).....	4
Figura 1.2. Classes de flavonoides e suas estruturas ⁴⁰	5
Figura 1.3. Diferenças na estrutura química das antocianinas mais abundantes na Natureza e seu $\lambda_{\text{máx}}$ ¹¹	6
Figura 1.4. Espécies em equilíbrio das antocianinas em meio aquoso e suas respectivas equações.....	9
Figura 1.5. Diagrama dos níveis de energia e passos cinéticos da malvidina-3-glucósido (oenin) ^{68, 72}	10
Figura 1.6. Reatividade geral da antocianina.....	11
Figura 1.7. Mecanismo de esterificação/hidrólise catalisada pela enzima CalB ⁹⁸	14
Figura 1.8. Representação conformacional da enzima lipase B da <i>Candida antarctica</i> com o centro ativo em destaque, em que (A) representação de conformação fechada de CalB e (B) representação da conformação aberta de CalB.....	15
Figura 1.9. Esquema de imobilização de enzimas por ultrafiltração.....	17
Figura 1.10. Esquema de síntese enzimática num reator de membranas.....	18
Figura 2.1. Monitorização do consumo de oxigénio na presença e na ausência de antioxidantes.....	31
Figura 3.1. Identificação cromatográfica por HPLC-DAD e por MS/ESI das antocianinas presentes no extrato obtido através do vinho (a) e a sua antocianina maioritária (a₁) e da amora (b) e o seu pigmento principal (b₁). I – Mv3glc (malvidina-3-O-glucósido); III – Dp3glc (delfinidina-3-O-glucósido); IV – Pt3glc (petunidina-3-O-glucósido); V – Pn3glc (peonidina-3-O-glucósido); II – Cy3glc (cianidina-3-O-glucósido); VI – Cy3rut (Cianidina-3-rutinósido); VII – Cy3dioxaglc (Cianidina-3-dioxaloyl-glucósido); e VIII - Cy3manglc (Cianidina-3-malonyl-glucósido).....	37
Figura 3.2. Estruturas químicas dos pigmentos antociânicos identificados nos extratos do vinho e da amora.....	38

Figura 3.3. Esquema da esterificação enzimática de Mv3glc com os diferentes dadores acilo, usando como catalisador a enzima <i>CalB</i>	40
Figura 3.4. Cromatogramas sobrepostos das reações enzimáticas, obtidos ao comprimento de onda máximo e representativos da conversão máxima de cada derivado acilado de Mv3glc.	41
Figura 3.5. Esquema da esterificação enzimática de Cy3glc com os diferentes dadores acilo, usando como catalisador a enzima <i>CalB</i>	42
Figura 3.6. Cromatogramas sobrepostos dos derivados acilados de Cy3glc e seu precursor, obtidos ao comprimento de onda máximo de pigmento.	42
Figura 3.7. Isolamento dos pigmentos acilados derivados de Mv3glc e Cy3glc por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.....	43
Figura 3.8. Espectro de massa do derivado acilado 14 obtidos por análise LC-DAD/ESI-MS, sendo (A) o espectro Full MS e (B) o espectro da primeira fragmentação (MS ²).....	47
Figura 3.9. Estrutura química do derivado lipofílico Cy3glc-C12.	48
Figura 3.10. Espectro COSY de Cy3glc-C12.....	50
Figura 3.11. Espectro 2D de HSQC de Cy3glc-C12.....	51
Figura 3.12. Espectro 2D de HMBC de Cy3glc-C12.	51
Figura 3.13. Formação do agregado micelar.	54
Figura 3.14. Evolução da degradação da absorvância de Cy3glc e os seus derivados lipofílicos sintetizados no seu respetivo comprimento de onda máximo, em soluções aquosas de SDS 0,1 M à temperatura ambiente a diferentes valores de pH.....	55
Figura 3.15. Espectro UV-Vis de Cy3glc e Cy3glc-C10 em SDS 0.1 M aquoso a pH 7, no início e após 9 dias de equilíbrio.....	56
Figura 3.16. Variação do espectro de absorvância de soluções equilibradas de Cy3glc (a) e Cy3glc-C10 na presença de micelas SDS após saltos de pH. Inserido nos gráficos - fitting dos valores experimentais de absorvância em função do pH (a) $pK'_a=5,3$ e (b) $pK'_a=6,0$	59

Figura 3.17. Soluções aquosas de (a) Cy3glc 5×10 ⁻⁵ M e (b) Cy3glc-C10 5×10 ⁻⁵ M em SDS 0,1M entre pH 3 e 7.....	59
Figura 3.18. Atividade antioxidante dos derivados lipofílicos de Mv3glc, bem como do seu precursor, determinado por (a) descoloração de β-caroteno e por (b) consumo de oxigénio.	61
Figura 3.19. Análise de amostra proteica liofilizada por espetrometria de massa por MALDI-TOF e SDS-PAGE.	64
Figura 3.20. Cromatogramas de Cy3glc-C8 no tempo máximo de formação de produto, sendo (a) reação decorrida no reator de membranas, com enzima imobilizada em membranas com <i>cut-off</i> de 10 kDa e (b) reação decorrida com enzima não modificada. 67	
Figura 3.21. Formação do produto Cy3glc-C8, num reator de membranas utilizando como catalisador a amostra proteica imobilizada numa membrana com <i>cut-off</i> de 10 kDa, sendo (A) após imobilização da enzima e (B) após imobilização da enzima e lavagem da membrana.	68
Figura 3.22. Concentração de Cy3glc-C8 durante a reação enzimática num reator de membranas, sendo (A) a reação que ocorreu na membrana, (B) a reação com membrana reutilizada e (C) a reação com enzima após duas utilizações da membrana.	69
Figura 3.23. Concentração de Cy3glc-C8 durante a reação enzimática num reator de membranas com enzima imobilizada, sendo (P10) a reação que ocorreu na membrana com 10 kDa de porosidade e (N1) a reação que ocorreu na membrana com 1 kDa de porosidade com membrana reutilizada e (C) a reação com enzima após duas utilizações da membrana.	70

Lista de Abreviaturas

2-metil-2-butanol – 2-Me-2-Bu

Absorvância – Abs

Acetato de etilo – AcOet

Ácido butírico – C4

Ácido caprílico – C10

Ácido hexanóico – C6

Ácido láurico – C12

Ácido mirístico – C14

Ácido octanóico – C8

Ácido palmítico – C16

Ácido trifluoroacético – TFA

Aciltransferase – AAT

Cianidina – Cy

Cianidina-3-dioxaloil-glucósido – Cy3dioxglc

Cianidina-3-glucósido – Cy3glc

Cianidina-3-glucósido-ácido butírico – Cy3glc-C4

Cianidina-3-glucósido-ácido caprílico – Cy3glc-C10

Cianidina-3-glucósido-ácido hexanóico – Cy3glc-C6

Cianidina-3-glucósido-ácido láurico – Cy3glc-C12

Cianidina-3-glucósido-ácido octanóico – Cy3glc-C8

Cianidina-3-malonil-glucósido – Cy3manglc

Cianidina-3-rutinósido – Cy3rut

Coeficiente de extinção molar – ϵ

Coeficiente de partição – Log P

Comprimento de onda de absorção máxima – $\lambda_{\text{máx}}$

Concentração micelar crítica - CMC

Constante cinética de degradação térmica – k

Constante de acoplamento – J

Correlation Spectroscopy – COSY

Cromatografia de camada fina (*Thin Layer Chromatography*) – TLC

Cromatografia de camada reversa de camada fina (*Reverse-Phase – Thin Layer Chromatography*) – RP-TLC

Delfinidina – Dp

Delfinidina-3-glucósido – Dp3glc

Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm) – δ

Dimetilsufóxido – DMSO

Dodecil sulfato de sódio – SDS

Eltrospray Ionization–Mass Spectrometry – ESI-MS

Equivalente – eq.

Fator de retenção (*Retention Factor*) – R_f

Heteronuclear Multiple Bond Connectivity – HMBC

Heteronuclear Single Quantum Connectivity – HSQC

Heptano – Hep

Hexano – Hex

Hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida) – AAPH

High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector – HPLC-DAD

Índice de hidrofobicidade – R_m

Internal diameter – *i.d*

Lipase B da *Candida Antarctica* – CalB

Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Detector – LC-MS

Malvidina – Mv

Malvidina-3-glucósido – Mv3glc

Malvidina-3-glucósido-ácido caprílico – Mv3glc-C10

Malvidina-3-glucósido-ácido hexanóico – Mv3glc-C6

Malvidina-3-glucósido-ácido láurico – Mv3glc-C12

Malvidina-3-glucósido-ácido mirístico – Mv3glc-C14

Malvidina-3-glucósido-ácido octanóico – Mv3glc-C8

Malvidina-3-glucósido-ácido oleico – Mv3glc-C18

Malvidina-3-glucósido-ácido palmítico – Mv3glc-C16

Massa do ião principal – MS

Membranas de ultrafiltração (*Ultrafiltration membrane*) – UF

Metanol – MeOH

Pelargonina – Pg

Peonidina – Peo

Peonidina-3-glucósido – Pn3glc

Petunidina – Pt

Petunidina-3-glucósido – Pt3glc

Poliétersulfona – PES

Polietileno – PE

Polipropileno – PP

Pressão atmosférica ionizante (Atmospheric Pressure Ionization) – API

Primeiro fragmento do ião principal – MS²

Segundo fragmento do ião principal – MS³

Relação massa/carga (espectrometria de massa) – m/z

Rendimento - η

Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Silica gel de fase reversa C18 – gel RP C18

Temperatura ambiente (*Room Temperature*) – Rt

Tempo – min

Tempo de retenção – Tr

Tempo de semi-vida – $t_{(1/2)}$

Tetraidrofurano - THF

Tetrametilsilano – TMS

Ultravioleta-Visível – UV-Vis

União Europeia (*European Union*) – EU

Unidades atómicas – u.a

I. Introdução

1. Introdução Geral

A indústria alimentar encontra-se em constante desenvolvimento devido aos requisitos dos consumidores, influenciados pela sociedade, pelo seu poder económico e a disponibilidade de recursos, entre muitos outros fatores. Atualmente, a sociedade influenciou o aparecimento de novas tendências no mercado alimentar, como o uso de alimentos multifuncionais e a diminuição do desperdício alimentar. Estas novas tendências, aliadas ao aparecimento de novas tecnologias, permitem responder não só aos requisitos nutricionais, sensoriais e económicos dos consumidores, como às suas preocupações sociais e éticas.

Uma das novas tendências no marketing de produtos alimentares baseia-se no aperfeiçoamento das características sensoriais dos alimentos, denominada de 'multi-sensory' ou multissensorial. Os atributos sensoriais como a cor, som e textura dos produtos alimentares são intensificados e utilizados de formas inovadoras, de forma a produzir a sensação de bem-estar e euforia no consumidor. Considerado um dos atributos sensoriais mais facilmente identificados, a cor do alimento pode levar à rejeição ou aceitação do produto, sendo este parâmetro por vezes utilizado como um indicador de qualidade pelo consumidor¹. Deste modo, a indústria recorre ao processo de aditivação, nomeadamente, na adição de aromatizantes, com o objetivo de intensificar ou restaurar a cor dos alimentos degradada durante o seu processamento e transporte, bem como garantir a uniformidade da matriz alimentar. No entanto, o uso de aromatizantes/corantes sintéticos tem vindo a diminuir. Apesar de possuírem a capacidade de corar alimentos, estes compostos, estáveis à temperatura, luz e resistentes a processos de oxidação, afetam a segurança do alimento². O uso de corantes na União Europeia (EU) é rigorosamente controlado devido aos riscos de saúde associados ao consumo de alimentos contendo conservantes sintéticos, sendo que a lista de corantes sintéticos aprovados é cada vez mais restrita. Corantes sintéticos contendo azoto, muito utilizados em guloseimas e bebidas refrigeradas, foram recentemente associados com problemas de saúde infantil, especificamente distúrbios de défices de atenção³. Assim, a substituição de corantes sintéticos por pigmentos naturais pode ser uma abordagem benéfica, uma vez que certos estudos não identificam efeitos nocivos no meio ambiente provocados por estes compostos.

Neste contexto, a perspetiva da utilização de antocianinas como corantes naturais é muito promissora. Na última década, estudos sobre este tipo de polifenóis relatam não só a sua grande capacidade de pigmentação, mas também propriedades benéficas para o organismo, sendo a sua aplicação em alimentos funcionais possível. Estes polifenóis, solúveis em água, existem no mundo vegetal, e são responsáveis pelas

cores ricas nas flores que variam entre o azul, vermelho e roxo. As antocianinas encontram-se maioritariamente em frutos, flores e vegetais, assim como em bebidas de extratos de vegetais como o chá, sumos e vinho. Devido à sua ubiquidade, as antocianinas fazem parte da dieta alimentar de várias culturas, não tendo sido associado qualquer efeito adverso ao seu consumo. De facto, estudos revelam que as antocianinas possuem características benéficas para o organismo como a sua capacidade antioxidante, assim como propriedades anticancerígenas, anti-mutagénicas e antimicrobianas, entre outras^{4, 5}.

1.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também designados por polifenóis, ocorrem naturalmente na Natureza, sendo estes o produto secundário do metabolismo das plantas. Estes metabolitos surgem como resposta da planta a agressões provocadas pelo meio (radiação UV, alterações climatéricas, stress oxidativo), causadas por ataques por fungos, bactérias e parasitas, ou por herbívoros e insetos⁶⁻⁸. Os polifenóis podem atuar como toxinas, precursores de sistemas de defesa ou mesmo como repelentes de predadores, podendo atuar como repelentes visuais ou químicos^{7,9}. Estes compostos desempenham ainda um papel importante na cor da planta e na sua maturação, assim como na atração de polinizadores¹⁰. Os polifenóis estão presentes na dieta humana em vários alimentos de origem vegetal, como por exemplo vegetais, frutos e sumos à base de extratos vegetais como os sumos de frutas, vinho, chá e café¹¹⁻¹³.

Os polifenóis despertaram o interesse dos consumidores pelas suas características nutricionais e propriedades organolépticas, sendo que estes desempenham um papel importante na cor e no sabor (ex: adstringência) dos alimentos. Atualmente, um consumo elevado em frutas e legumes está associado à prevenção de doenças neurodegenerativas causadas por elevado stress oxidativo, como o Alzheimer e Parkinson^{14, 15}, assim como à redução do risco de aparecimento de doenças cardiovasculares¹⁶ e de cancro¹⁷. Um estudo correlacionou o consumo moderado de vinho tinto com a baixa incidência de problemas cardiovasculares numa comunidade francesa, apesar da sua dieta ser rica em gorduras saturadas e possuírem hábitos tabágicos, conhecido como o Paradoxo francês^{18, 19} (Tabela 1.1). Os polifenóis estão associados à prevenção de doenças causadas pelo elevado stress oxidativo, devido à sua capacidade de interagir com espécies reativas de oxigénio (ROO•), enzimas oxidativas e pela quelatação de metais envolvidos no stress oxidativo²⁰⁻²².

Tabela 1.1. O paradoxo francês¹⁸

Região	Colesterol detetado no plasma (mg/dL)	Mortalidade por doenças cardiovasculares (per 10 ⁴)
França (Paris)	216	102
França (Tolouse)	224	78
USA (Standford)	209	182
Reino Unido	240	380

Os polifenóis caracterizam-se por possuírem pelo menos um anel aromático substituído por um ou mais grupos hidroxilo e constituem uma vasta e complexa família de compostos presentes no reino vegetal. Dependendo da sua estrutura, os polifenóis que ocorrem naturalmente no tecido vegetal podem ser de natureza flavonóide ou não-

flavonóide. Nos bagos de uva, os compostos não-flavonóides encontram-se nas películas e polpa enquanto que os flavonóides existem maioritariamente nas películas, nos engaços e nas grainhas²³⁻²⁶. De um ponto de vista sensorial, as classes de fenólicos mais importantes presentes no vinho são os ácidos hidroxicinâmicos, os flavan-3-óis e as antocianinas, pois influenciam diretamente a cor e o sabor dos vinhos (adstringência)^{27, 28}.

Na indústria farmacêutica, o interesse na aplicação tecnológica destes compostos é elevado pois os polifenóis possuem propriedades biológicas importantes na prevenção de doenças cardiovasculares e de algumas doenças neurodegenerativas^{17, 29, 30}. De facto, foi recentemente revelado que alguns compostos fenólicos estão associados ao retardamento do envelhecimento celular e influenciam a regeneração das células³¹⁻³³. Aos flavonóides têm sido atribuídos vários efeitos fisiológicos benéficos, nomeadamente, atividade antioxidante³⁴, anti-inflamatória³⁵, anti-mutagénica³⁶, antiviral³⁷, vasoprotectora³⁸, antibacteriana³⁶, antialérgica³⁹, entre muitos outros.

Os polifenóis podem ainda ser aplicados na indústria alimentar e cosmética, devido às suas propriedades biológicas e cromáticas anteriormente relatadas.

1.1.1. Flavonóides

Os flavonóides são uma das classes de compostos polifenólicos, constituídos por dois anéis aromáticos A e B, ligados por uma ponte de 3 carbonos (anel heterocíclico pirânico C), ou seja, seguem uma estrutura do tipo C₆-C₃-C₆ (Figura 1.1).

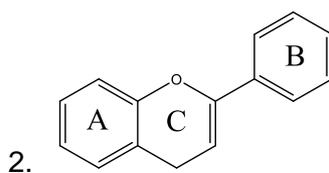


Figura 1.1. Estrutura base dos compostos flavonóides (2-fenilbenzopirano)

A estrutura base dos flavonóides dá origem às diferentes espécies que ocorrem na Natureza, dependendo do nível de insaturação do anel C. As principais subclasses de flavonóides identificadas são as flavonas, as flavanonas, os flavonóis, os flavononóis, os flavan-3-óis e as antocianidinas, entre outros (Figura 1.2). Estas subclasses de compostos aromáticos diferem entre si dependendo do nível de insaturação do anel C, bem como as diferentes metilações ou hidroxilações que podem sofrer. Os flavonóides são ainda capazes de se ligarem covalentemente a açúcares, adquirindo maior estabilidade. Na Natureza, os flavonóides existem glicosilados, podendo também existir na sua forma aglicona. Os açúcares ligados aos flavonóides mais comuns são a glucose

e a ramnose, embora também possam ser a galactose, a xilose, e a arabinose, entre outros. Os flavonóides mais abundantes nos vinhos são os flavan-3-óis e as antocianidinas glicosiladas (antocianinas), sendo as restantes subclasses de flavonóides menos comuns.

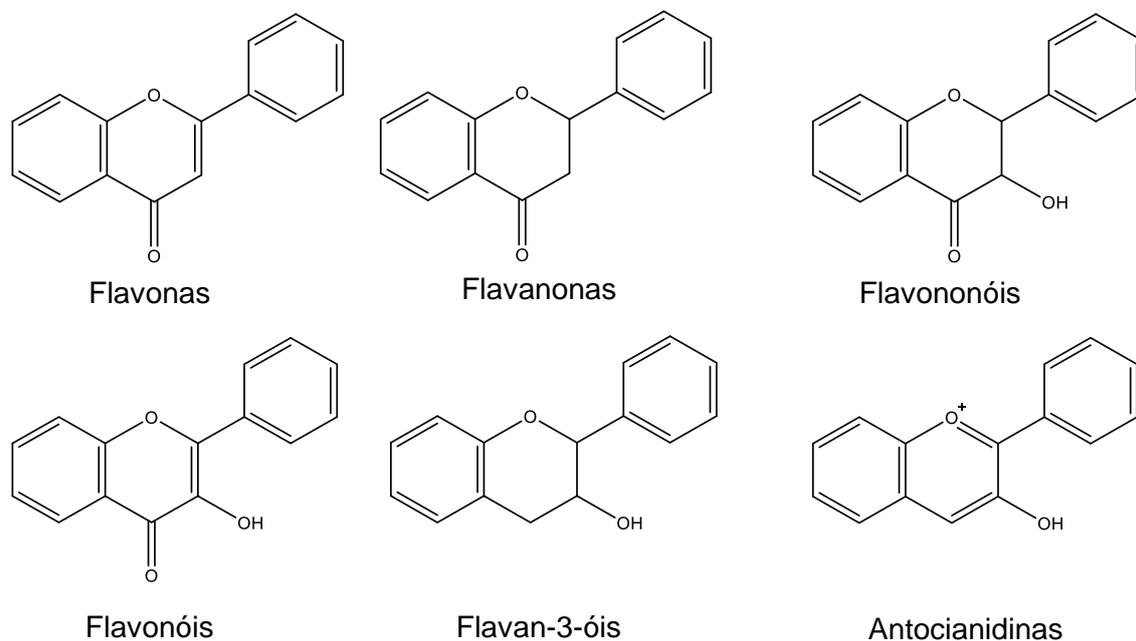


Figura 1.2. Classes de flavonoides e suas estruturas⁴⁰

As antocianinas (do grego *antho*, que significa flor, e *kianos*, significando azul) fazem parte de uma das mais abundantes famílias de flavonóides na Natureza, tendo sido, até agora, identificadas e isoladas cerca de 600 estruturas diferentes⁴¹. Estes compostos solúveis em água ocorrem naturalmente no reino vegetal, existindo maioritariamente nos frutos e flores, mas também em bebidas de extratos vegetais, como o vinho, chá e sumos vegetais⁴²⁻⁴⁴. As antocianinas estão presentes em diferentes tecidos vegetais, nas pétalas das flores angiospérmicas, folhas jovens e frutos, e são responsáveis por cores desde o vermelho, o violeta e o azul. Estes metabolitos desempenham um papel fundamental na polinização/dispersão de sementes de flores e na maturação dos frutos⁴⁵⁻⁴⁷. As antocianinas são essenciais nas interações simbióticas entre insetos e plantas. As cores atrativas das flores, fruto da pigmentação causada pelas antocianinas, atraem os insetos que assistem na dispersão do pólen⁴⁸. Por outro lado, um dos parâmetros da maturação do fruto passa pela quantificação e caracterização do perfil antociânico presente no alimento (Tabela 1.2), que varia dependendo do estado de maturação⁴⁹⁻⁵¹. O conteúdo antociânico varia com os fatores genéticos do fruto, assim como com as condições de cultivo, da região e dos métodos

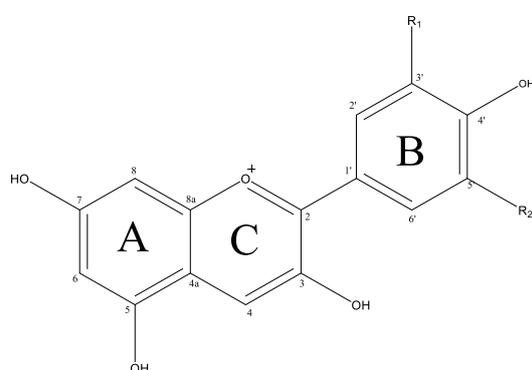
de extração, resultando numa grande variabilidade de antocianinas entre frutos da mesma espécie⁵²⁻⁵⁴.

Tabela 1.2. Concentração de antocianinas de diversas de fontes alimentares vegetais, como bebidas frutos e vegetais⁴⁵

Origem	Concentração de antocianinas (mg/kg)
Sabugueiro	2000–15600
Mirtilo	4600
Amora	820-1800
Beterraba	150-450
Morango	150-350
Cereja	3500-4500
Framboesa preta	1700-4277
Groselha	460-2000
Uvas tintas	400-750
Ameixa	20-250
Vinho Tinto	240-350
Vinho do Porto	140-1100

Estruturalmente, as antocianinas são derivadas do catião flavílio (2-fenilbenzopirílio) glicosilado, ou seja, a antocianidina ligada a um açúcar. Devido ao seu longo cromóforo, formado por oito ligações duplas conjugadas com carga positiva, estes compostos apresentam cores intensas em condições acídicas. O seu comprimento de absorção de onda máxima na região do visível encontra-se entre os 465 nm e os 550 nm, enquanto que o outro máximo de absorção se situa na zona entre os 270 nm e os 280 nm.

Atualmente, foram descobertas cerca de 18 antocianindinas, sendo que as mais comuns são a cianidina (Cy), a malvidina (Mv), a peonidina (Pn), a pelargonina (Pg), a petunidina (Pt) e a delphinidina (Dp) (Figura 1.3). Devido à sua maior estabilidade, as antocianinas-3-glucósido são ainda mais abundantes, sendo que a cianidina-3-glucosida é a mais difundida na Natureza¹¹.



	R ₁	R ₂	Cor*	$\lambda_{\text{máx}}$
Cianidina	OH	H	Rosa	535
Peonidina	OCH ₃	H	Rosa	532
Pelargonina	H	H	Vermelho	520
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Roxo	542
Delfinidina	OH	OH	Roxo	546
Petunidina	OCH ₃	OH	Roxo	543

*observável em meio aquoso com 0.01 % HCl

Figura 1.3. Diferenças na estrutura química das antocianinas mais abundantes na Natureza e seu $\lambda_{\text{máx}}$ ¹¹

As substituições que geralmente ocorrem no anel B nas posições 3' e 5', são grupos metilo ou hidroxilo e são responsáveis pelas diferenças nas propriedades físicas

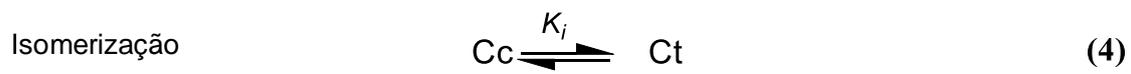
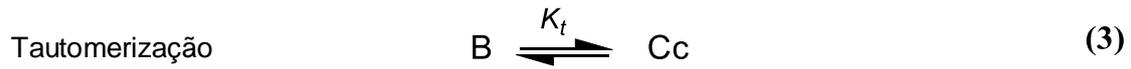
destes flavonóides, bem como das suas cores^{55, 56}. Como já foi referido, as antocianinas são derivados glicosídeos da forma aglicona, podendo a glicosilação acontecer com um mono- di ou trissacárido, na posição C3 do anel C, resultando numa grande variabilidade de estruturas. Adicionalmente, os resíduos glicosilados podem sofrer acilação por ácidos aromáticos, como o ácido cafeico, ferúlico, gálico, ou p-cumárico, ou por ácidos alifáticos como o ácido malónico, acético, málico, oxálico ou succínico⁵⁷.

A glicosilação e acilação das antocianinas influenciam as propriedades físico-químicas destes compostos, nomeadamente a polaridade e tamanho da molécula, assim como a sua reatividade e estabilidade. A acilação dos resíduos glicosilados causa uma diminuição de polaridade, diminuindo a solubilidade destes compostos em meios aquosos, enquanto que a glicosilação confere maior estabilização e aumenta a solubilidade das antocianinas, comparativamente à sua forma aglicona^{58, 59}. Estas modificações contribuem também num aumento da resistência à variação do pH, e à sua exposição à luz e temperatura, devido à formação de ligações por pontes de hidrogénio que ocorrem na antocianina^{57, 60}. O grau de hidroxilação também é importante para a estabilidade da antocianina, uma vez um grande número de grupos substituintes hidroxilados resultam na diminuição da estabilidade da molécula, contrariamente ao que ocorre quando o maior número de substituintes são metilados^{60, 61}. A acilação pode contribuir para o aumento da lipofilicidade da antocianina, podendo alterar as suas interessantes propriedades biológicas. Assim, é essencial determinar algumas das propriedades biológicas (poder antioxidante) tal como a sua lipofilicidade.

No que toca à aplicação tecnológica das antocianinas, a estabilização destes pigmentos é essencial. Não só a estabilidade influencia a aplicação das antocianinas em formulações lipídicas, mas também o seu armazenamento. Estes flavonóides são instáveis a fatores como o oxigénio, temperaturas elevadas e até mesmo à luz e ao pH⁶²⁻⁶⁵. De facto, as antocianinas devem a sua elevada reatividade, em grande parte à variação de pH. Em meio aquoso, as antocianinas existem sob diversas formas de equilíbrio, dependendo do pH^{66, 67} (Figura 1.4), nomeadamente, o catião flavílio (cor vermelha), a forma carbinol ou hemiacetal (incolor), a base quinoidal (cor azul a roxa) e a chalcona (cor amarela). A fração molar de cada uma destas espécies varia consoante o pH do meio.

Em condições ácidas, $\text{pH} \leq 1$, o catião flavílio (AH^+) é predominante, sendo a espécie responsável pela cor vermelho-púrpura intensa visível em solução. Quando o pH aumenta ocorrem duas reações em paralelo: a rápida transferência de protões **(1)** e, mais lentamente, a reação de hidratação do catião flavílio **(2)**, dando origem à base quinoidal neutra (A), e à forma hemiacetal (B), respetivamente. Posteriormente, a valores de pH mais elevados, a base quinoidal neutra pode dar origem à base aniónica

(A⁻). As espécies chalconas, possuindo cor amarela, surgem devido à tautomerização da forma hemiacetal **(3)** que dá origem à chalcona-*cis* (C_c). As antocianinas podem ainda sofrer a isomerização da espécie C_c, dando origem à chalcona-*trans* (C_t) **(4)**, sendo que a sua formação ocorre muito lentamente e em pequenas quantidades.



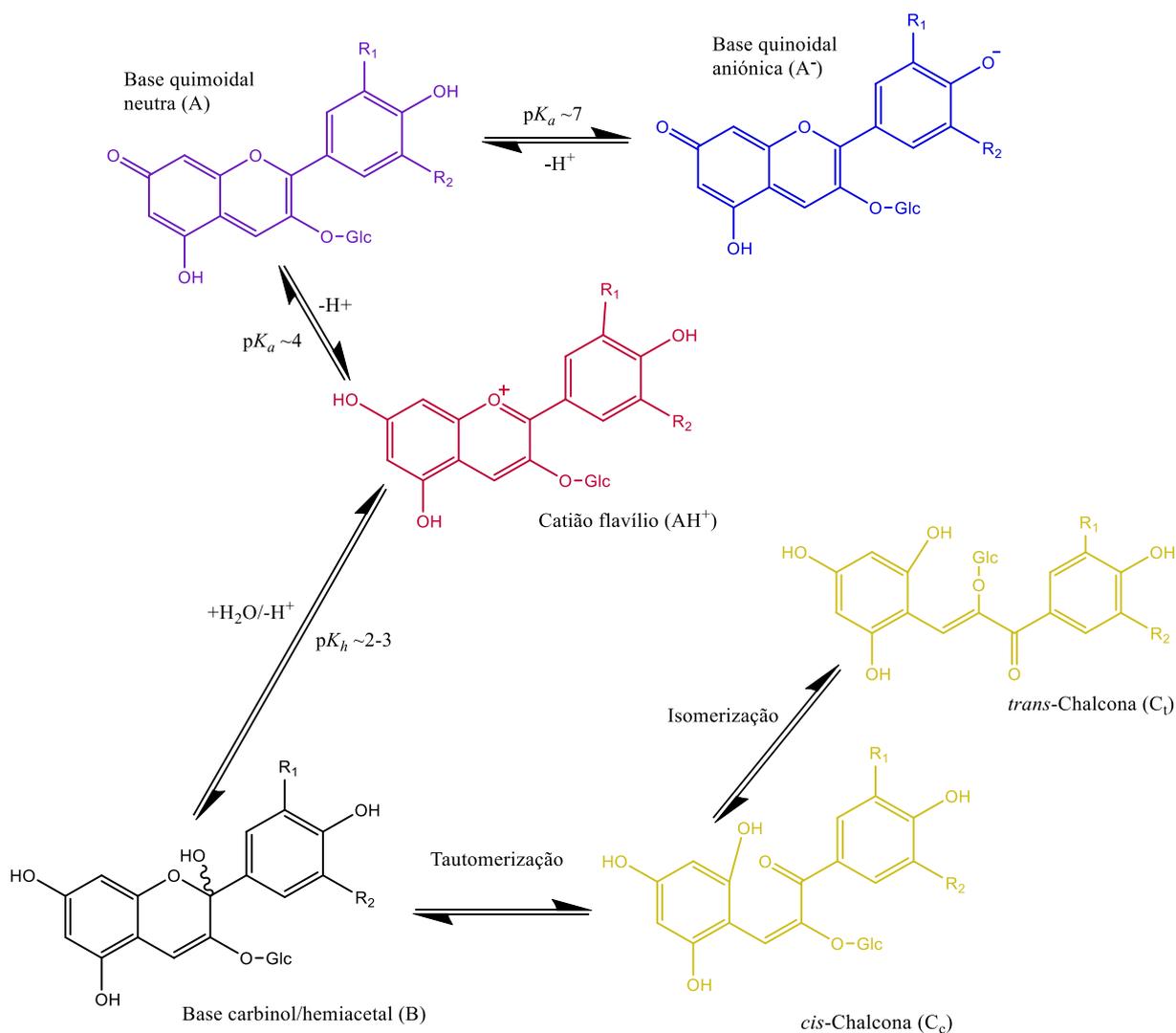


Figura 1.4. Espécies em equilíbrio das antocianinas em meio aquoso e suas respectivas equações.

A formação das espécies antociânicas é influenciada pelo pH do meio assim como pela cinética dos equilíbrios. A forma hemiacetal, a espécie mais estável, é predominante entre os valores de pH 3 e 5, sendo que a estes valores de pH, todas as estruturas de antocianinas coexistem em equilíbrio⁶⁸ (Figura 1.5). Quando todas as espécies estão em equilíbrio, exceto da formação de Ct, que ocorre muito lentamente, sendo possível determinar a constante de equilíbrio aparente, K^a (5).

$$K^a = K_a + K_h + K_h K_t \quad AH^+ + H_2O \rightleftharpoons CB + H_3O^+, \text{ com } [CB] = [B] + [Cc] + [A] \quad (5)$$

Uma forma simples e eficaz de estudar os equilíbrios das espécies antociânicas é efetuada através dos saltos diretos de pH. Os saltos de pH, por definição ocorrem aquando a adição de base a soluções contendo catião flavílio, perturbando o equilíbrio da amostra, e observando os processos que decorrem até um novo equilíbrio ser atingido. No momento em que ocorre a adição de base na solução é visível a

transferência de prótons originando a base quinoidal neutra, cuja formação ocorre na escala dos microssegundos, em competição com a espécie hemiacetal. A espécie hemiacetal rapidamente dá origem a *cis*-chalcona. Neste momento o sistema entra em equilíbrio, pois a formação de Ct ocorre muito lentamente. Quando o sistema entra em equilíbrio é possível determinar a constante acídica aparente⁶⁹⁻⁷¹, K'_a , definida pela equação (6):

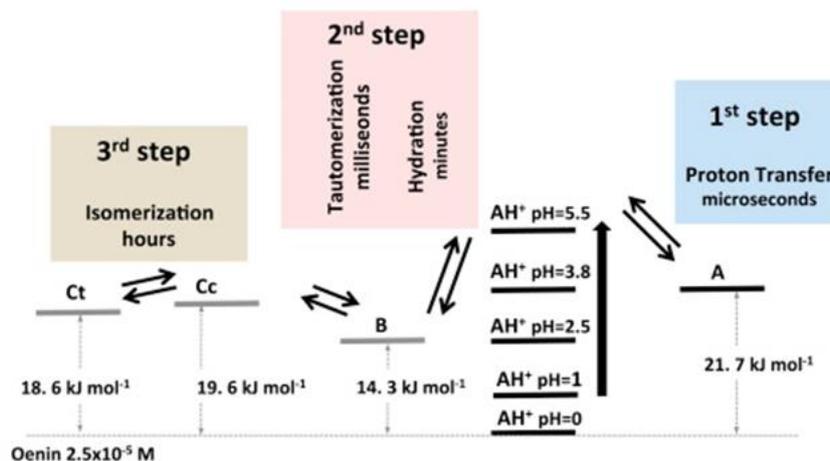


Figura 1.5. Diagrama dos níveis de energia e passos cinéticos da malvidina-3-glucósido (oenin)^{68, 72}



$$\text{com } [\text{CB}] = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{Cc}] + [\text{Ct}] \quad (6)$$

Como já foi referido, as antocianinas são compostas por dois anéis aromáticos e um anel pirânico central, C. Na sua forma iónica, ou seja, na forma de catião flavílio, o anel C possui carga positiva, deslocalizada sobretudo nos carbonos C2 e C4, sendo suscetível a ataques nucleofílicos pela água e pelo bissulfito (Figura 1.6), dando origem à sua forma incolor. No entanto, quando a antocianina se encontra na sua forma hemiacetal podem ocorrer ataques por compostos eletrófilos nos carbonos C6 e C8 do anel A, ativados devido aos grupos hidroxilados localizados nas posições *orto* e *para* do anel aromático.

Adicionalmente, o anel B, dependendo do número de substituintes hidroxilados que apresenta, pode atuar como um agente redutor. Após a sua oxidação, pode ainda sofrer oxidações acopladas ou adições de Michael atuando como um poderoso eletrófilo.

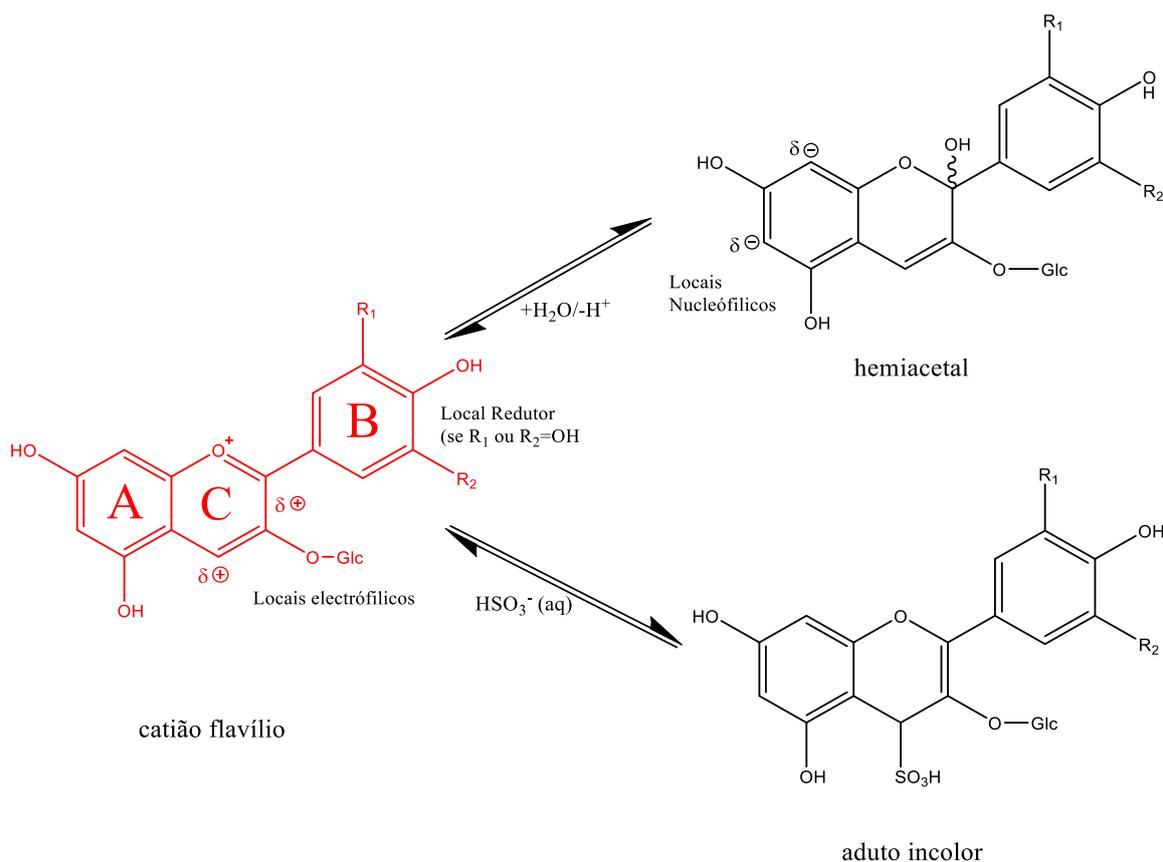


Figura 1.6. Reatividade geral da antocianina.

A degradação das antocianinas é também influenciada pela presença de oxigénio, sendo este um dos fatores mais importantes, juntamente com a temperatura, na degradação da cor deste tipo de flavonóides. O oxigénio presente no meio pode causar a degradação da antocianina por mecanismos de oxidação que, direta ou indiretamente, provocam a oxidação destes pigmentos, dando origem a produtos incolores ou castanhos. A luz também foi considerada como um fator provocador da degradação das antocianinas. Foi evidenciado que os produtos da degradação fotoquímica são os mesmos que os que são obtidos através da degradação térmica, embora por vias diferentes⁷³.

Durante o processamento e armazenamento, foi observado que a estabilidade das antocianinas diminui com a temperatura. O aumento da degradação das antocianinas ocorre devido à deslocalização de equilíbrio das formas antociânicas para a formação de hemiacetal⁷⁴. Esta variação de equilíbrios provoca a perda da cor da solução após aquecimento. Entre os valores de pH 2 e 4, o efeito da temperatura provoca a formação de antocianidinas instáveis, devido ao aumento das hidrólises que ocorrem nas antocianinas-3-glucósidas, o que resulta na diminuição da cor^{74, 75}.

Na Natureza é possível observar cores em certas flores e nos vinhos tintos que não seria possível tendo em conta apenas a influência do pH. No entanto, através de

vários mecanismos, as antocianinas possuem a capacidade de estabilizar a sua cor. Estudos reportam que é possível observar as cores azul e vermelho, em condições alcalinas, devido a fenômenos de complexação com metais, auto-associação⁷⁶, copigmentação intermolecular⁷⁷ ou de copigmentação intramolecular⁷⁸ e acilação⁷⁹.

Um dos métodos de estabilização das antocianinas mais comuns é a acilação, sendo que cerca de 65% das antocianinas cuja estrutura foi já caracterizada encontram-se aciladas. A diversidade estrutural das antocianinas é expandida através da acilação com ácidos aromáticos ou substituintes alifáticos, ligados, geralmente, ao resíduo de glicose.

Tal como sucede em vários mecanismos de copigmentação, a adição de um grupo acilado fornece à antocianina a proteção de ataques nucleofílicos provocados pela água, fornecendo à antocianina maior estabilidade⁸⁰⁻⁸². A modificação de antocianinas, pela adição de múltiplos grupos aromáticos, provoca um aumento da estabilidade da cor e o seu espectro de absorção sofre uma ligeira variação, tendendo para comprimentos de onda mais típicos da cor azul. Assim, podemos assumir que a acilação pode influenciar a coloração de muitas flores e frutos^{83, 84}. Alguns estudos reportam que a presença de grupos acilo intensifica a auto-associação das antocianinas, providenciando ainda maior estabilidade à molécula⁸⁵. A estabilidade pode também depender do tipo de dador acilo e do local a que se encontra ligado.

A acilação pode ocorrer por catalisadores químicos e enzimáticos, sendo que devido aos avanços no campo da bioquímica e da genética, foi possível criar métodos de acilação de antocianinas mais seletivos e menos dispendiosos⁸⁶.

1.2. Catalisadores enzimáticos

A indústria tem em consideração o custo económico envolvido na síntese de novos compostos assim como as suas possíveis precursões ambientais. Atualmente, é preferível a utilização de processos bioquímicos verdes (menor impacto ambiental, baixa toxicidade, mais sustentáveis) onde a reutilização de recursos e a obtenção de elevados rendimentos são possíveis com baixo impacto ambiental. Deste modo, o uso de catalisadores oferece vários benefícios. Por definição, um catalisador afeta o equilíbrio de uma reação sem ser substancialmente consumido. Assim, um catalisador eficiente deve reter a sua atividade após várias reutilizações. No entanto, a retenção de catalisadores dissolvidos na mistura reacional é dificultada, limitando a sua reutilização⁸⁷. Assim, a imobilização de catalisadores é uma abordagem a ter em conta. Uma classe muito versátil de catalisadores são as enzimas. As enzimas, também denominadas de biocatalisadores, são proteínas que possuem elevada eficiência e a

capacidade de influenciar processos biológicos⁸⁸. Estes biocatalisadores possuem elevada quimio- e regioseletividade e detêm atividade em condições menos agressivas, permitindo que a síntese ocorra sem recorrer a elevadas temperaturas ou pressões. Apesar de apenas cerca de apenas 1% de enzimas terem sido identificadas e caracterizadas, um vasto grupo destas proteínas possuem características ótimas para a sua utilização como catalisadores⁸⁹.

As reações mediadas por enzimas, ou bioconversão, podem ser divididas em dois grandes grupos; fermentações ou reações mediadas por processos biocatalíticos. Na fermentação, o reagente, também denominado de substrato, é utilizado para a produção do biocatalisador, assim como para a reação de interesse. Atualmente estão estabilizados vários processos envolvendo a fermentação para o fabrico de produtos como por exemplo aminoácidos, ácido láctico, ácido succínico, entre outros^{90, 91}. Os processos biocatalíticos, são definidos pela produção independente do catalisador (enzima) e do produto final desejado^{92, 93}. Os processos biocatalíticos podem ainda ser divididos em três classes; catálise mediada por leveduras, catálise mediada por apenas uma enzima e catálise mediada por enzima imobilizada. A escolha do tipo de catálise é crucial, pois influencia a formação do produto e as condições em que esta ocorre.

Atualmente a acilação sintética das antocianinas é catalisada, maioritariamente, por enzimas⁹⁴. A acilação enzimática, está descrita como formando apenas um éster e não uma mistura de isómeros, facilitando o seu isolamento. Também está descrito que a acilação enzimática obtém rendimentos superiores, comparativamente à acilação química.⁹⁵ O substrato, contendo grupos carboxílico, liga-se ao centro ativo da enzima formando um intermediário, libertando um subproduto, normalmente água. Devido à interação enzima-substrato, é possível a ligação com um grupo dador de hidróxidos, ao intermediário, formando um complexo ácido carboxílico-enzima-hidróxido. Ao interagir com os dois substratos, a enzima permite a sua ligação covalente, formando o éster que é libertado para o meio^{96, 97} (Figura 1.7).

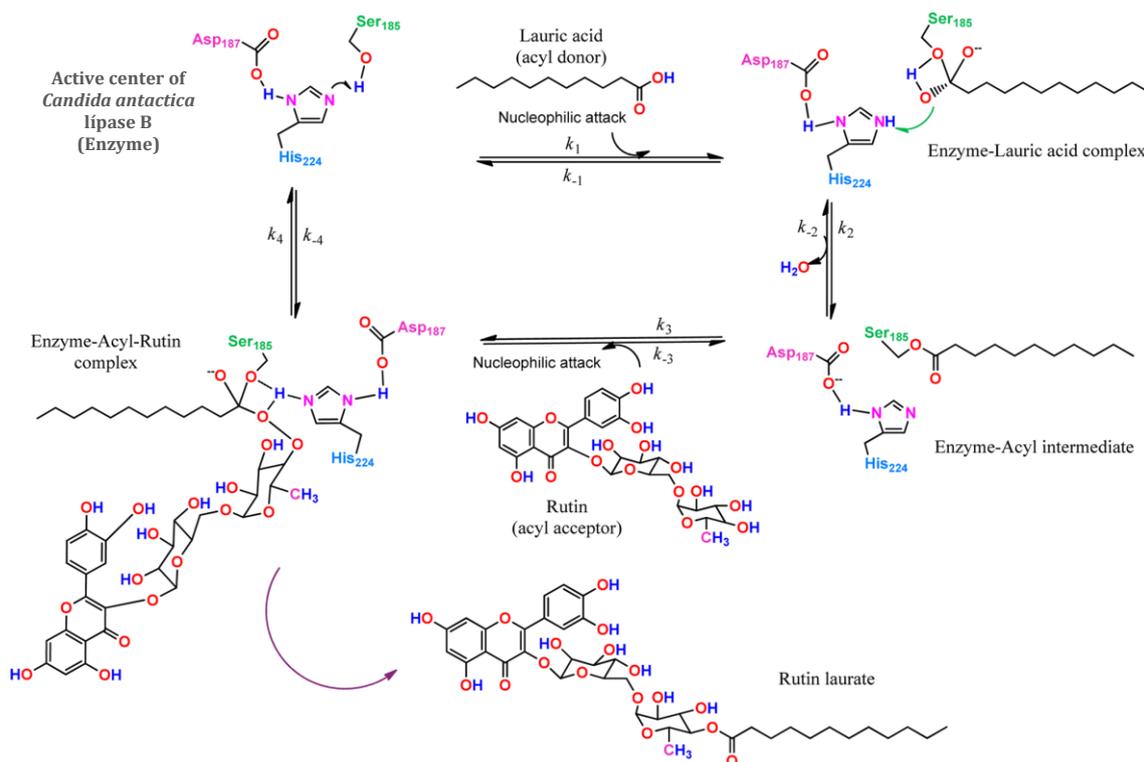


Figura 1.7. Mecanismo de esterificação/hidrólise catalisada pela enzima CalB⁹⁸.

A enzima lipase B da *Candida antarctica* (CalB) está descrita como sendo das enzimas mais utilizadas na indústria e nos laboratórios de investigação devido à sua elevada atividade enzimática⁹⁹⁻¹⁰³. A proteína CalB possui uma estrutura terciária globular, com o peso molecular compreendido entre 30-35 kDa, e é constituída por cerca de 317 aminoácidos. Através da determinação cristalina da molécula foi possível determinar que os aminoácidos hidrossolúveis da enzima se encontram próximo do centro ativo da enzima, enquanto que os aminoácidos hidrofóbicos existentes na molécula estão localizados na periferia da proteína. Através da determinação da estrutura foi também possível identificar que o centro ativo de CalB é constituído por uma tríade-catalítica composta por três aminoácidos; o ácido aspártico, a serina e a histidina^{104, 105}. A estrutura terciária da molécula, cuja organização é influenciada pelas interações hidrofóbicas, permite que a enzima se desloque para a interface da água e dos lípidos, maximizando a interação entre o doador álcool e o doador do grupo carboxílico. Contrariamente à maioria das enzimas, CalB não possui uma estrutura protetora em forma de hélice a proteger o seu centro ativo, sendo este protegido quando a enzima altera a sua conformação (Figure 1.8).

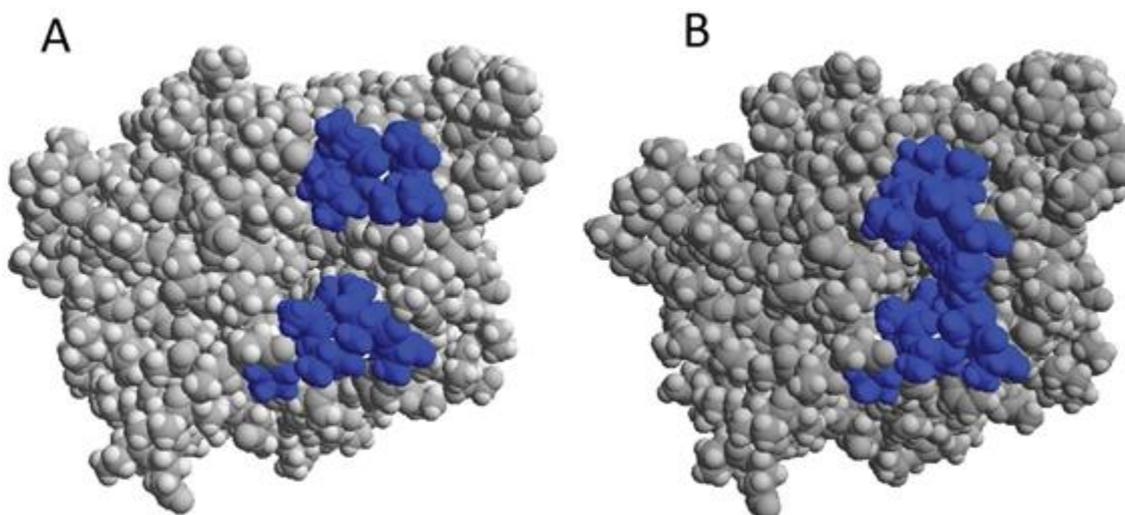


Figura 1.8. Representação conformacional da enzima lipase B da *Candida antarctica* com o centro ativo em destaque, em que (A) representação de conformação fechada de CalB e (B) representação da conformação aberta de CalB.

Em meio aquoso CalB está descrita com capacidade de hidrolisar ésteres, enquanto que em solventes orgânicos, a enzima possui a capacidade de catalisar o processo de esterificação. A hidrólise e a esterificação estão num equilíbrio que é influenciado pela concentração de água na mistura reacional, pelo que a percentagem de água deve ser criteriosamente controlada. De facto, estudos referem que uma percentagem baixa de água é necessária de modo a atingir a atividade enzimática máxima sem, no entanto, afetar o equilíbrio da reação para a hidrólise¹⁰⁶.

A acilação enzimática é influenciada por três fatores; o tipo de solvente utilizado, a estrutura do dador acilo e a temperatura. Dependendo da concentração dos produtos e dos reagentes, a reação pode ser influenciada num sentido; na formação de um éster ou na hidrólise do éster. De modo a contrariar este efeito o uso de reagentes em excesso, como o uso do dador acilo e a remoção de água através de filtros moleculares. A temperatura também é um fator importante a considerar. As enzimas utilizadas na esterificação são endotérmicas, ou seja, necessitam de energia para reagirem. Sendo o aumento da temperatura um dos métodos mais simples de fornecer energia, muitas das esterificações ocorrem sob o efeito da temperatura. Solventes orgânicos muito apolares não permitem que a enzima altere a sua estrutura de modo a que o centro ativo desta seja acessível. Solventes como o THF e DMSO desnaturam a enzima, perdendo a sua atividade. A escolha do solvente deve ter em conta a capacidade de dissolver os reagentes e produto e não desnaturar a enzima.

1.3. Imobilização de enzimas

O uso de enzimas como biocatalisadores fornece muitas vantagens, pois não só são as enzimas biocompatíveis e biodegradáveis como também podem ser reutilizadas. Os processos enzimáticos possuem ainda a capacidade de sintetizar produtos em condições menos agressivas (temperatura, pressão atmosférica, pH do meio, ...), em meios aquosos, com elevada seletividade. Sínteses mediadas por enzimas eliminam a necessidade de adicionar grupos funcionais necessários para a ativação/proteção de produtos intermediários, sendo assim mais sustentáveis, provocando menos impacto ambiental. Nas últimas duas décadas, os biocatalisadores emergiram como uma importante ferramenta tecnológica, em resposta à elevada procura de processos mais verdes e sustentáveis. Como consequência do avanço da biotecnologia e manipulação de proteínas, surgiu uma biblioteca de enzimas comerciais com as características desejadas, dependendo do pH, especificidade do substrato, atividade e seletividade. No entanto, e apesar das inúmeras aplicações das enzimas, o uso destes catalisadores a longo termo é limitado. Processos de reutilização de enzimas não são eficientes, afetando a sua reutilização, e a sua atividade diminuí ao longo do tempo. A imobilização de enzimas surge como resposta a estas dificuldades. A enzima imobilizada é mais fácil de manusear, encontrando-se sob a forma sólida em vez de uma formulação líquida, e facilita a separação desta com a mistura reacional, minimizando a contaminação da proteína, facilitando assim a sua recuperação e reutilização. A imobilização da enzima influencia também a reatividade da enzima. Estudos comprovam que enzimas imobilizadas são mais estáveis, causando um aumento na síntese de produtos^{107, 108}. No entanto, dependendo do tipo de interação entre o material de suporte e a enzima, a imobilização pode ser, ou não, benéfica. Uma imobilização eficiente depende a atividade enzimática que é influenciada pela orientação da enzima, por possíveis alterações conformacionais que podem levar à inatividade e à sua imobilização. Atualmente a imobilização de enzimas ocorre por três diferentes métodos; por adsorção, através do seu aprisionamento ou por *cross-linking*¹⁰⁹.

A adsorção da enzima, ocorre através da ligação da enzima a um suporte físico (Figura 1.9). Esta ligação pode ser de natureza física, devido a interações hidrofóbicas, por forças van der Waals, iónica ou até mesmo de natureza covalente¹¹⁰. A adsorção física não é muito utilizada, devido à sua baixa capacidade de reter a enzima no suporte quando esta se encontra exposta a condições elevadas de pressão e temperatura. As adsorções iónicas e covalentes têm maior capacidade de reter a enzima, no entanto com a adsorção covalente existe o risco de inativar a proteína, tornando-a inutilizável.

Os suportes mais utilizados são resinas sintéticas ou biopolímeros como os polissacáridos e os sólidos inorgânicos (sílicas)¹¹¹.

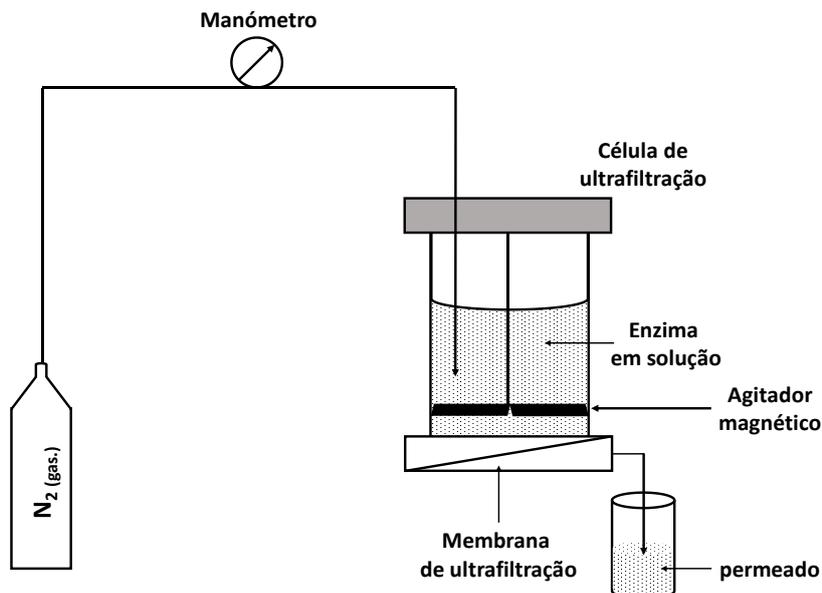


Figura 1.9. Esquema de imobilização de enzimas por ultrafiltração.

O aprisionamento da enzima é um processo muito semelhante à adsorção. A enzima fica retida numa rede de polímeros, com matrizes orgânicas ou inorgânicas, em microcápsulas ou em membranas porosas. No entanto, as interações enzima-suporte são demasiado fracas para garantir o aprisionamento total da enzima. O processo de aprisionamento de enzima requer a síntese de uma matriz polimérica na presença da enzima, contrariamente à adsorção, cujo suporte já se encontra na sua forma sólida.

A agregação da enzima, denominada por *cross-linking*, funciona na formação de complexos de enzima, não necessitando de um suporte. Este processo tem a vantagem de utilizar elevadas concentrações de enzima com elevada atividade, sem a adição de custos devido ao uso de um suporte adicional^{112, 113}. O método de imobilização de enzima deve ser cuidadosamente escolhido em função do tipo de enzima e da reação em que a enzima atua.

1.4. Reatores de membranas

Atualmente, as preocupações da indústria centram-se na otimização das sínteses, de modo a obter maior quantidade de produto a baixo custo económico, simultaneamente diminuindo a formação de subprodutos sem utilidade. Como resposta a estes requisitos surgiram o uso de imobilização de enzimas assim como os reatores de membranas.

A utilização de enzimas como catalisadores é agora muito utilizada na indústria devido à sua elevada produtividade e seletividade e baixa toxicidade. No entanto, a

utilização destes catalisadores é limitada devido à sua degradação ao longo do tempo. A imobilização de enzimas fornece alguma estabilidade às proteínas, podendo estas adquirir resistência a solventes orgânicos. Recentemente, reatores de membranas surgiram como resposta à necessidade de produção em grande escala. Os reatores de membranas providenciam duas grandes vantagens; a utilização de um catalisador enzimático imobilizado aliado à possibilidade de produzir compostos continuamente (a reação pode ocorrer de forma contínua). No entanto, a sua aplicação é limitada, devido aos seus elevados custos, à maior libertação de enzima e sua alteração conformacional e a acumulação de detritos da membrana¹¹⁴⁻¹¹⁶. Durante a imobilização a enzima pode alterar a sua estrutura de modo a expor o seu centro ativo que facilita a reação, porém o risco da desnaturação da proteína é aumentado devido à alteração da estrutura proteica, sendo a enzima mais vulnerável à desnaturação¹¹⁷. As enzimas imobilizadas em membranas são mais suscetíveis à libertação da enzima devido às pressões provocadas pela passagem da mistura reacional (Figura 1.10). Deste modo, são necessários vários estudos relacionando a seletividade da membrana assim como da sua porosidade com a pressão permitida para a produção contínua de produto, reaproveitando a enzima na membrana.

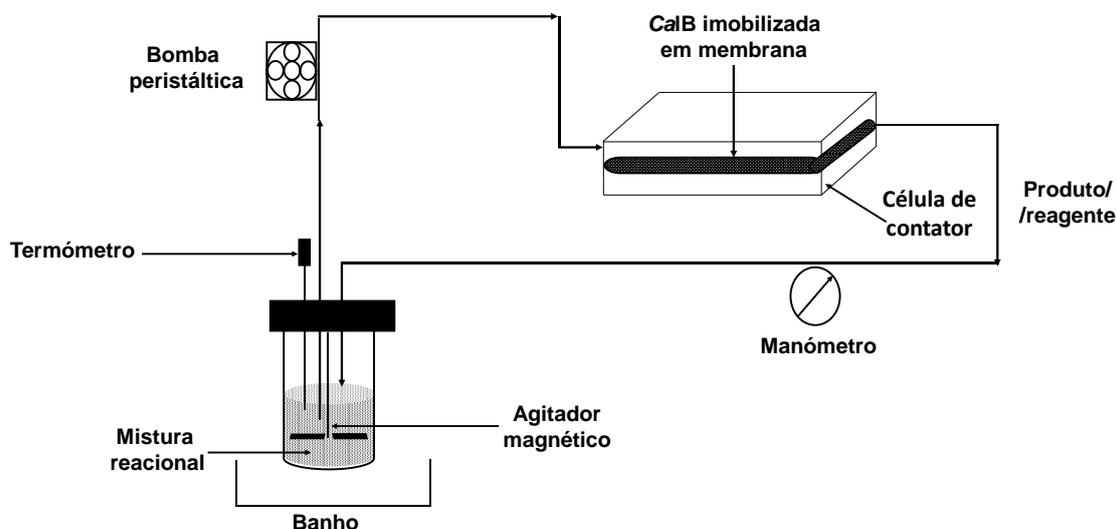


Figura 1.10. Esquema de síntese enzimática num reator de membranas.

Objetivos

Assim com este trabalho propõem-se os seguintes objetivos:

- Síntese de diferentes pigmentos acilados derivados de duas antocianinas monoglucósidas;
- Caracterização da lipofilicidade e atividade antioxidante dos pigmentos sintetizados;
- Estudo da estabilidade da cor dos pigmentos sintetizados por variação do pH e temperatura;
- Desenvolvimento de um método alternativo para a síntese dos pigmentos lipofílicos por imobilização de enzimas em sistema de membranas.

II. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes

Os solventes utilizados são de qualidade analítica ou superior. Metanol (99,8%), acetonitrilo (99,9%), hexano (99%), heptano (95%) e ácido fórmico (99%) foram adquiridos à Merck®. (Darmstadt, Alemanha). O dimetilsufóxido (DMSO), dimetilsufóxido deuterado, ácido clorídrico deuterado e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Madrid, Espanha). O hidrogénio fosfato de potássio, di-hidrogénio potássio de fosfato, hidróxido de sódio, e o hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida), (AAPH), foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Madrid, Espanha), assim como o Hepes, o Trolox, e a l- α -fosfatidilcolina de soja. O ácido clorídrico (37%) e o cloreto de sódio foram adquiridos à Fluka® (Bucharest, Romania) e o Acetato de etilo (99,8%) à Panreac Chem® (Barcelona, Espanha).

O gel de sílica de fase reversa C18, Lichroprep (40-63 μ m) foi adquirida à Merck® (Darmstadt, Alemanha). A Lipase B de *Candida antarctica* (CalB) em resina acrílica (≥ 5000 U/g, recombinante, expressa em *Aspergillus niger*) foi adquirido à Sigma-Aldrich® (Madrid, Espanha) e CalB em estado sólido (pó) foi generosamente fornecida pela Genofocus® (Daejeon, Coreia do Sul). Os ácidos gordos usados na esterificação; ácido butírico (99%), ácido hexanóico (99,5%), ácido octanóico (99%), ácido cáprico (98%), ácido láurico (99%) e o ácido mirístico (99%) e ácido palmítico (97%) foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Madrid, Espanha)

As membranas assimétricas utilizadas na imobilização da enzima foram adquiridas à MICRODYN-NADIR® (Wiesbaden, Alemanha) e à Pall Industries® (Hampshire, Inglaterra). As células de amicon modelos 8050 e 8200 foram adquiridas à Merck® (Darmstadt, Alemanha).

2.2. Técnicas cromatográficas e de análise estrutural

2.2.1. Cromatografia líquida de alta pressão, HPLC-DAD

As análises por cromatografia líquida de alta pressão foram realizadas no HPLC da marca Merck®, Hitachi L-7100, equipado com um detetor de dióxido, Merck Hitachi L-7450^a.

Os extratos, assim como os as antocianinas monoglucósidas isoladas, foram analisados por HPLC com uma coluna de fase reversa C18 (150 x 127 mm x 4,6 mm i.d., Thermo Scientific), termostaticada a 25 °C Os solventes utilizados foram (A) – água/ácido fórmico 9:1 (v:v) e (B) – água/acetonitrilo/ácido fórmico 6:3:1 (v:v), com o seguinte gradiente: 20-80% B por 80 min, com um fluxo de 0,5 mL/min. A deteção foi

realizada com um detetor fotodíodo, sendo que foi realizado o varrimento entre os 200 e os 600 nm, com obtenção do cromatograma a 280 e a 520 nm.

A pureza dos derivados lipofílicos da Cy3glc e da Mv3glc foi analisada numa coluna de fase reversa C8 (150 mm × 2 mm, i.d., 5 µm, Vydac 208TP 123 C8, Grace Davidson Discovery Sciences, Stenungsund, Polónia) termostaticada a 25 °C, usando como eluentes (A) – água/ácido fórmico 9,9:0,1 (v:v) e (B) – acetonitrilo/ácido fórmico 9,9:0,1 (v:v), com o seguinte gradiente: 0-20% de B durante 5 min, 20-100% de B durante 10 min, passando a 100% de B de modo isocrático durante 15 min com um fluxo de 0,4 mL/min. A coluna foi lavada com 100% de B e estabilizada durante 15 min nas condições iniciais. A deteção foi realizada com um detetor fotodíodo, sendo que foi realizado o varrimento entre os 200 nm e os 600 nm, com obtenção do cromatograma a 280 nm e no máximo de absorção de cada composto.

A deteção de material proteico nas amostras de permeado da imobilização de enzimas também ocorreu por análise HPLC. A análise das amostras foi efetuada num HPLC de marca Waters® Alliance 2695, equipado com um detetor fotométrico Waters®, Alliance 2998 PDA, numa coluna C18-ACE 300 (5µ, 250 x 4,6 mm, Ultra-inert, Advanced Chromatography Technologies Ltd, Aberdeen, Escócia), termostaticada a 25 °C. Os solventes utilizados (A) – água/TFA 9:1 (v:v) e (B) – acetonitrilo/TFA 9:1 (v:v) com um gradiente de 5 para 50 % de B durante 50 min, seguido de 100 % de B e de modo isocrático, durante 15 min, a um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi lavada com 100% de B e estabilizada durante 15 min nas condições iniciais. A deteção foi realizada com um detetor fotodíodo, sendo que foi realizado o varrimento entre os 190 nm e os 300 nm.

2.2.2. Cromatografia de camada fina, TLC

A monitorização da eliminação do ácido gordo livre durante a extração líquido-líquido foi realizada através da cromatografia de camada fina, TLC, de acordo com a literatura¹¹⁸. As amostras foram aplicadas numa placa de sílica (20 cm x 20 cm de placas de alumínio, revestidas com várias camadas de 0,2 mm de gel sílica), sendo o solvente evaporado e colocadas numa câmara previamente saturada com o eluente (hexano/acetato de etilo, 3:3, (v:v)). Após eluição, a placa de TLC foi retirada da câmara eliminando o eluente, por evaporação ao ambiente. A deteção de ácido gordo foi observada em placas de sílica diretamente mergulhadas numa solução indicadora de pH, bromocresol verde.

2.2.3. Espectrometria de massa, LC-MS

Os derivados lipofílicos foram analisados por espectrometria de massa LC-MS/ESI. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida no LC-MS de marca

Finnigan Surveyor equipado com um detetor de massa LCQ DECA XP MAX (Finnigan Corp., San Jose, Califórnia), uma fonte ionizante à pressão atmosférica (API) usando uma ionização por electrospray, ESI, e uma coluna de fase reversa C8 (150 mm × 2 mm, i.d., 5 µm, Vydac 208TP 123 C8, Grace Davidson Discovery Sciences) termostaticada a 25 °C nas mesmas condições que as análises dos derivados por HPLC, anteriormente referidas. As voltagens do vaporizador e do capilar foram, respetivamente, 5 kV e 4 V. A temperatura do capilar foi de 325 °C. O azoto foi usado como revestimento e como gás auxiliar a um fluxo de 90 e 25, respetivamente (em unidades arbitrárias). O espectro foi obtido no modo positivo com a gama de m/z entre 250 e 1500. O espectrómetro de massa foi programado para fazer uma série de scans: 'full mass' (MS), um 'zoom scan' (MS²) e, em certos casos, uma análise MS-MS do ião mais intenso usando a energia de colisão relativa de 30 e 60 (MS³).

2.2.4. Ressonância Magnética Nuclear, RMN

Os espetros do protão, ¹H (600.13 MHz) e de carbono 13, ¹³C (125.77 MHz), foram obtidos à temperatura de 303 K em DMSO deuterado/TFA 9:1 num espectrómetro Bruker-Advance 600, usando TMS como padrão interno. Os desvios químicos, δ, foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento, *J*, em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram designadas como singletos (s), dupletos (d), duplos dupletos (dd), tripletos (t) e multipletos (m). Os desvios químicos de ¹H foram atribuídos usando RMN 1D e 2D (COSY), enquanto que as ressonâncias de ¹³C foram atribuídas usando técnicas de RMN 2D (*g*HMBC e *g*HSQC). O atraso para a constante de acoplamento da correlação C/H a longa distância foi otimizado para 7 Hz.

2.3. Obtenção dos extratos antociânicos e isolamento das antocianinas maioritárias

Através de vinho tinto de mesa foi extraído a antocianina Mv3glc, como é descrito na literatura¹¹⁹. Concentraram-se cerca de 50 L de vinho de mesa tinto por nanofiltração, seguido de evaporação do etanol. Os açúcares livres foram removidos por cromatografia de fase reversa em gel de sílica C18 (RP C18) e o extrato bruto obtido sofreu extrações líquido-líquido com acetato de etilo (H₂O, AcOet 1:1, (v/v)). Após a eliminação dos compostos orgânicos exceto os flavonóides, a fração aquosa, rica em antocianinas, foi então aplicada num funil de bückner, previamente carregado com gel RP-C18, eluindo o extrato com uma solução de 30 % de MeOH acidulado com 0,01 % de HCl. O solvente foi eliminado por rotavapor e o extrato purificado rico em Mv3glc foi liofilizado e armazenado a -18 °C. O isolamento de Mv3glc decorreu a partir de 20 mg do extrato

previamente purificado através de cromatografia líquida em coluna de vidro com gel RP C18. A antocianina glicosilada é isolada utilizando como eluente a solução aquosa de 20 % MeOH acidulado com 0,01 % HCl

A partir de amoras frescas, *Rubus fruticosus*, foi possível extrair Cy3glc com elevada pureza. Durante 24 h, cerca de 1 kg de amoras frescas sofreram a extração dos seus compostos fenólicos, sob agitação, com 2 L de solução aquosa de 50 % de MeOH acidulado com 0,1 M HCL. Após 1 h de extração o solvente foi mudado, adicionando mais 5 L do mesmo solvente, permanecendo em extração durante as restantes 23 h. O solvente orgânico foi evaporado e a fase aquosa aplicada num funil de bückner, previamente carregada com gel RP-C18 para remoção de açúcares. Cy3glc foi obtida por cromatografia de gel RP-C18 usando 10 % MeOH acidulado com 0,01 % HCl. Por evaporação ocorreu a eliminação do solvente orgânico e o composto puro foi liofilizado e armazenado a -18 °C.

2.4. Síntese e isolamento de derivados lipofílicos de antocianinas

A obtenção dos novos compostos lipofílicos derivados de Mv3glc e Cy3glc foi efetuada de acordo com a literatura¹²⁰, com algumas alterações. Num Schlenk com filtros moleculares ativados de dimensão 4Å (100 g/L) foi adicionado a fonte de antocianina (correspondente a 2.67 g/L de antocianina pura) dissolvidos em 2-metil-2-butanol anidro (15 mL), juntamente com o respetivo ácido gordo em excesso, tendo sido utilizados ácidos gordos com comprimentos diferentes da cadeia carbonada, desde o ácido butírico até ao ácido palmítico (100 eq.). A reação apenas tem início aquando a adição da enzima CalB (20 g/L), imobilizada em resina acrílica. Reação ocorre a 60 °C, sob suave agitação. A formação de composto foi monitorizada por HPLC-DAD.

Após atingir a formação máxima do produto esterificado, as reações foram terminadas, e deu-se início ao seu isolamento. A mistura reacional foi filtrada, removendo os filtros moleculares e enzima, seguida de eliminação do solvente por rotavapor. A mistura reacional foi ressuspendida em MeOH acidulado com 0,01 % HCl e por separação líquido-líquido com heptano e hexano (MeOH, Hep 1:1, (v/v), seguido de (MeOH, Hex 1:1, (v/v)) e foi rejeitado o excesso de ácido gordo. A monitorização da eliminação do excesso de ácido gordo foi efetuada por TLC. A fração de MeOH foi aplicada em cromatografia reversa numa coluna de vidro com gel de sílica C18, após a eliminação do solvente orgânico. A antocianina que não reagiu foi recuperada com 30 % de MeOH com 0,01 % de HCl e o éster foi eluído com 50 a 80 % de MeOH com 0,01 % de HCl, dependendo da polaridade do composto. O solvente orgânico foi eliminado e

o composto liofilizado e armazenado a -18 °C para posterior utilização em ensaios antioxidante.

A análise da pureza dos derivados lipofílicos e sua caracterização estrutural foram determinadas por HPLC-DAD e por LC-MS e RMN.

2.5. Caracterização físico-química dos derivados

2.5.1. Parâmetros de lipofilicidade

De modo a caracterizar o balanço hidrofílico-lipofílico dos compostos sintetizados, foram determinados o coeficiente de partição (log P) e o índice de hidrofobicidade (R_m).

Valores teóricos de log P foram determinados utilizando o software Molinspiration¹²¹, que se baseia em métodos fragmentais. Valores experimentais de Log P foram determinados com uma mistura bifásica de água e octanol pelo método de agitação do frasco. Previamente, água acidulada com 2 % de HCl e n-octanol foram saturados 24 h antes da sua utilização. Os compostos (Cy3glc, Mv3glc e os seus respetivos derivados foram dissolvidos em n-octanol pré-saturado com água (3 mL) num frasco, tendo sido adicionado o mesmo volume de água acidificada saturada com n-octanol, (concentração final de 0,12 mM). Os frascos foram agitados durante 1 h e permaneceram repouso durante 24 h de modo à separação chegar a um equilíbrio. Ambas as fases foram analisadas por HPLC-DAD, tendo sido analisadas as áreas a 280 nm.

$$\text{Log } P = \left(\frac{A_{\text{octanol}}}{A_{\text{água}}} \right)$$

Onde os valores de $A_{\text{água}}$ a área da amostra detetada a 280 nm por HPLC-DAD na fração de água e A_{octanol} a área detetada por HPLC-DAD a 280 nm na fração de octanol de cada amostra. Os valores de índice de hidrofobicidade (R_m) foram determinados por cromatografia de fase reversa de camada fina RP-TLC baseada no método descrito na literatura, com algumas modificações^{99, 122}. Os valores de R_m foram calculados segundo a fórmula:

$$R_m = \text{Log} \left(\frac{1}{R_f - 1} \right)$$

Onde R_f é o fator de retenção obtido através da RP-TLC. As placas usadas foram placas de sílica 60 RP-18 F254 e as amostras foram eluídas com acetonitrilo/ácido acético/água (1:40:8, v/v/v). Compostos foram detetados com luz UV a 254 nm.

2.6. Estabilidade da cor dos derivados de Cy3glc por efeito da temperatura e do pH

2.6.1. Estudo cinético da degradação térmica

O estudo cinético decorreu de acordo com a literatura^{85, 123}, com algumas alterações. As soluções stock dos derivados lipofílicos de Cy3glc, e da Cy3glc (0,3 mM) foram dissolvidas em SDS 0,1 M com HCl 0,001 M. Em frascos fechados foi adicionado 1 mL das soluções stock dos pigmentos, 1 mL da solução SDS 0,2 M com NaOH 0,001 M e 1 mL de solução tampão ao pH desejado (pH3, pH5 ou pH7), obtendo uma concentração final dos pigmentos de 0,1mM em SDS 0,1M. A medição de pH foi realizada através de um medidor de pH/iões (Radiometer Copenhagen PM240). Os pigmentos a diferentes pH's foram submetidos a temperaturas elevadas (65 °C, 80 °C e 95 °C) durante 10 h, protegidas da luz. A medição dos espectros de absorção decorreu ao longo do tempo, após o arrefecimento rápido das amostras em gelo. Para uma placa com 96 poços foram transferidos 100 µL de cada amostra e os seus espectros foram analisados num espectrofotómetro da marca Varian-Cary 100 Bio (Biotek Powerwave XS), sendo que foi realizado o varrimento entre 350 e 600 nm, de modo a conter o máximo de absorção para cada composto. O tempo zero de absorvância foi observado antes de submeter as amostras ao efeito da temperatura. A cinética da reação (k), que segue uma equação de primeira ordem, e o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), foram calculadas através das fórmulas (7) e (8)

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k \times t \quad (7)$$

$$t_{(1/2)} = -\ln\left(\frac{1}{2}\right) \times k^{-1} \quad (8)$$

Onde C_t é a concentração de amostra após t min, C_0 a concentração de amostra no tempo zero e t o período de tempo que a amostra sofreu a degradação térmica. A energia de ativação, E_a , foi determinada através da equação (9), onde R é a constante de gás universal (8.314 J/mol K), e T a temperatura em Kelvin.

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (9)$$

2.6.2. Determinação da constante de equilíbrio, pK'_a

A determinação da constante de equilíbrio, pK'_a , foi efetuado através de expressões de saltos do pH⁷². As soluções stock dos pigmentos (0,15 mM) foram preparadas em solução SDS aquoso (0,1 M com 0,001 M HCl). De modo a manter a concentração final de pigmento (5×10^{-5} M) e SDS (0,1 M), as variações de pH ocorreram por adições para a célula de quartzo, de volumes iguais de soluções de NaOH aquoso (0,001 M) em SDS (0,2 M), do tampão universal ao pH desejado, e da solução stock de pigmento. O pH das soluções foi medido antes da variação de pH, através do medidor de pH. Os espectros de absorção foram analisados por espectrofotômetro de marca Evolution array. Os valores de pK'_a foram determinados através da relação entre o valor experimental de pH e da absorvância.

2.7. Propriedades antioxidantes

Também decorreram ensaios de atividade antioxidante, nomeadamente ensaios de peroxidação lipídica, através do método de descoloração pelo β -caroteno e através do método de medição do consumo de oxigénio.

2.7.1. Método de β -caroteno

O método de branqueamento de β -caroteno estuda o efeito de inibição da peroxidação do ácido linoleico⁹⁹ e foi avaliado do seguinte modo: 400 μ L de β -caroteno (0,1 mg/mL em clorofórmio), 4,4 μ L de ácido linoleico e 40 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado e misturado com 500 μ L de metanol e 4,5 mL de água. A emulsão foi agitada vigorosamente. Os compostos foram dissolvidos em MeOH (200 μ M), e 225 μ L da solução de β -caroteno foi adicionado, sendo transferidos para uma placa com 96 poços. O controlo foi uma solução 25 μ L de MeOH e o branco foi realizado na ausência de ácido linoleico. As amostras foram expostas a oxidação causada pela temperatura durante 90 min a 50 °C num leitor de placas. O tempo zero de absorvância foi observado a 470 nm imediatamente após adição da emulsão ter sido adicionada e após 90 min de incubação. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada de acordo com a fórmula

$$\%inibição = \left[1 - \frac{(A_0 - A_t)}{(A'_0 - A'_t)} \right] \times 100$$

Onde A_0 é a absorvância da amostra no tempo zero, A_t a absorvância da amostra após período de incubação (90 min a 50 °C), A'_0 a absorvância do controlo no tempo inicial e A'_t a absorvância da amostra após o período de incubação. As experiências foram realizadas em triplicado.

2.7.2. Método de consumo de oxigénio

A peroxidação lipídica pelo método de consumo de oxigénio envolveu a preparação prévia de material lipídico, nomeadamente, lipossomas. A preparação de lipossomas decorreu conforme indicado na literatura⁸¹. A solução de l- α -fosfatidilcolina, previamente dissolvida em clorofórmio, foi levada à secura por uma corrente contínua de árgon. Para garantir a eliminação total dos solventes orgânicos, o filme lipídico foi colocado sob vácuo durante 3 h. De modo a criar lipossomas multilamelares, o filme lipídico foi ressuspensionado em tampão Hepes (Hepes 10 mM, 0,1 M NaCl, pH 7,4). Em seguida, e de modo a normalizar os espaços internos das vesículas lipídicas formadas, realizaram-se ciclos de congelação/descongelação, sendo que a congelação foi realizada por mergulho em azoto líquido e a descongelação foi realizada a 37 °C. No final dos ciclos a suspensão lipídica foi mantida a 37 °C durante 30 min, de modo a atingir o equilíbrio. A obtenção de vesículas unilamelares (lipossomas) foi realizada pela extrusão da suspensão lipídica num extrusor em ácido inoxidável (Lipex), utilizando um filtro de policarbonato (Corning, 100 nm).

A peroxidação lipídica dos lipossomas ocorreu pela indução de radicais peróxido ($\text{LOO}\cdot$) gerados pela degradação do hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida) (AAPH), a uma razão constante, na presença e na ausência de antioxidantes, sendo foi utilizado como referência o Trolox. A peroxidação foi seguida através da monitorização do consumo de oxigénio. Estes ensaios decorreram em condições ótimas, determinadas já na literatura⁸¹. A mistura reacional com 340 μM de solução de lipossomas unilamelares, 100 μM de solução stock de amostra ou antioxidante de referência e 10 μM do iniciador da reação (AAPH), num volume final de 1500 μL de tampão Hepes. O consumo de oxigénio foi medido com o elétrodo de oxigénio tipo Clarck (Hansatech®) numa célula fechada a 37 °C, sob agitação. A capacidade antioxidante foi avaliada graficamente pelo período de indução, calculado, de acordo com a fórmula (10), através da interseção das retas tangentes traçadas entre o período em que a oxidação é inibida (existe proteção antioxidante) e em que esta inibição deixa de ocorrer, tal como mostra a Figura 2.1.

$$\frac{t_i}{t_{i_{\text{trolox}}}} = \frac{(t_f - t_i)}{(t_f - t_i)_{\text{trolox}}} \quad (10)$$

Onde $(t_f - t_i)$ é o período de indução da amostra e $(t_f - t_i)_{trolox}$, o período de indução do antioxidante de referência (Trolox). Os ensaios foram realizados em triplicado.

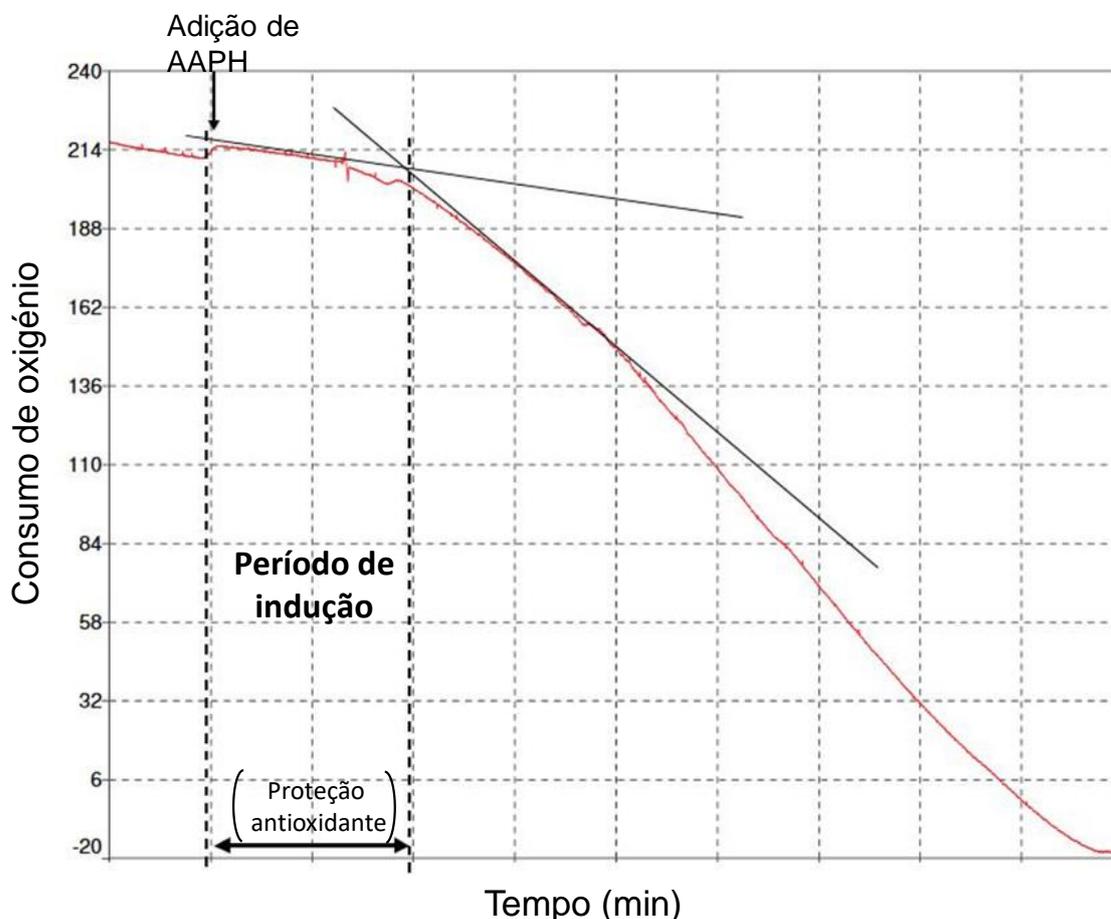


Figura 2.1. Monitorização do consumo de oxigénio na presença e na ausência de antioxidantes.

2.8. Processo biológico contínuo - reator de membrana

2.8.1. Seleção de membranas como suporte enzimático

As membranas utilizadas na imobilização da enzima foram selecionadas tendo por base a porosidade, tipo de material que são constituídas e resistência a solventes orgânicos. Deste modo, decorreram ensaios de resistência a solventes orgânicos. Os solventes escolhidos foram os descritos na literatura em que a esterificação enzimática ocorre; o acetonitrilo, o 2-Me-2-Bu, e a acetona.

Num frasco fechado, contendo uma membrana com 1 cm x 1 cm de área, foi adicionado um dos solventes acima mencionados, garantindo a completa emersão da membrana. A resistência da membrana ao solvente foi medida através da alteração do seu aspeto, nomeadamente, da sua cor, textura, comprimento, largura e, da espessura, que foi medida antes e após emersão com um micrómetro.

2.8.2. Imobilização de enzima no suporte de membrana

A imobilização da enzima CalB decorreu em membranas compósitas de ultrafiltração (UF), tendo sido previamente removida a camada protetora da membrana composta por glicerol com a passagem de tampão fosfato (0,1 M, pH 6). A imobilização de CalB (0,5 g/L, dissolvida em tampão fosfato 0,1 M, pH 6) na membrana decorreu numa célula de permeação pressurizada com a membrana com camada de suporte em contato direto com a solução de CalB. O processo de imobilização ocorreu sob a pressurização de um fluxo constante de azoto (0,028 bar), monitorizado por um barómetro. Alíquotas da solução permeada foram analisadas por HPLC assim como por espectrofotómetro UV-Vis da marca Evolution array. A determinação da percentagem de CalB adsorvida pela membrana foi calculada com base no balanço de massas, tendo em conta massa total de enzima na solução inicial, $CalB_{inicial}$, a massa de enzima que permanece na célula (volume que não permeou a membrana), $CalB_{conct}$ e a massa da enzima removida na permeação da membrana, ao longo da imobilização, $CalB_{perm}$.

$$CalB = \frac{CalB_{inicial}(g) - (CalB_{perm}(g) - CalB_{conct}(g))}{CalB_{inicial}(g)} \times 100$$

2.8.3. Determinação do perfil proteico

A pureza da enzima liofilizada fornecida foi determinada através de dois métodos: a análise por MALDI-TOF e por SDS-PAGE.

2.8.3.1. Análise por eletroforese, SDS-PAGE

As amostras de proteína proveniente da *Aspergillus niger* foram analisadas por SDS-PAGE (Electrophoresis Power Supply-EPS 601, GE Healthcare Life Sciences) num gel com 16 % de acrilamida. As amostras foram dissolvidas em ureia (8 M) com uma concentração final de 12,5 µg/µL e centrifugadas. Alíquotas do sobrenadante de amostra (4 µL) foram adicionados ao tampão Laemmli (26 µL). Durante o processo da desnaturação as amostras foram inicialmente colocadas a 65 °C durante 10 min num misturador (Thermomixer comfort), seguido de um período de incubação a 95 °C por 5 min. A eletroforese decorreu a corrente elétrica constante, sendo que esta aumentou (de 206 mA para 30 mA) no momento em que as proteínas iniciaram a sua migração. Após a migração, as proteínas foram fixadas com uma solução de água/metanol/ácido acético (40:50:10, v:v), mergulhadas, à temperatura ambiente, por 30 min numa solução de água/metanol/ácido acético (88:5:7, v:v). O gel foi corado com azul brilhante

coomassie durante 2 h, de modo a visualizar as bandas no gel e descorado com água/metanol/ácido acético (50:40:10, v:v). A imagem do gel foi obtida por um transiluminador (VWR Genosmart).

2.8.3.2. Análise por MALDI-TOF

A análise MALDI-TOF foi efetuada em espectrometria de massa, m/z , (UltrafleXtream) em modo ião positivo linear com laser SmartBeam-III controlado através do software FlexCompass (BrukerDaltonics, Alemanha). A análise dos dados foi efetuada através do software Flex Analysis (Bruker Daltonics, Billerica MA, USA). Em cada espetro decorreu um varrimento de 5 a 200 kDa, sendo que ocorreram 1000 disparos de laser com a frequência de 2000 Hz. O software comunica automaticamente abundâncias de iões, rácios de S/N, sinal de resolução de massa, área do pico e massas monoisotópicas.

A matriz de MALDI usada na análise foi trans-2-[3-(4-terc-Butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB). A solução matriz foi preparada com DCTB (7,6 mg) dissolvido em etanol (375 μ L), sendo também adicionado solução aquosa de citrato de amónio di-hidrogenado ($C_6H_8O_7 \cdot 2NH_3$) (125 μ L, 18 mg/mL). As amostras de enzima liofilizada (2 μ L) foram dissolvidas em metanol e TFA foi adicionado (2 μ L, 2 %), seguido da adição de solução matriz (2 μ L). A mistura amostra-matriz foi pipetada pelo processo 'up and down' várias vezes até iniciar a sua cristalização. Uma alíquota da mistura (2 μ L) foi então aplicada numa placa de metal inoxidável, seco à temperatura ambiente (MTP 394 placa em metal inoxidável BC, Bruker Daltonik, Alemanha). As análises decorreram em triplicado.

2.8.4. Reações enzimáticas num reator de membranas

A síntese do derivado de Cy3glc com o ácido octanóico utilizando a enzima adsorvida à membrana decorreu nas mesmas condições das reações já referidas^{119, 120}, com algumas modificações. A esterificação ocorreu numa célula de contactor, onde a membrana com enzima previamente adsorvida se encontra (até 0,132055 mg de enzima por mm^2 da membrana) com fluxo cruzado. Num recipiente fechado, com filtros moleculares ativados, Cy3glc e o ácido gordo foram dissolvidas em 2-metil-2-butanol. Para garantir a dissolução completa da antocianina, o recipiente manteve-se em agitação há temperatura de 60 °C durante 1 h. A célula de contactor com fluxo cruzado foi conectada ao recipiente fechado com a mistura reacional. A mistura reacional entrou em contacto com a membrana, nomeadamente a camada de suporte, com um fluxo

constante (0,969101 mL/min). O recipiente contendo a mistura reacional manteve-se sob agitação a 65 °C. A formação de produto foi monitorizada por HPLC-DAD.

2.8.4.1. Estudo comparativo da estabilidade da enzima

Em simultâneo às sínteses no reator de membranas, decorreram sínteses do derivado Cy3glc-C8 com enzima liofilizada em *bulk*. Num frasco fechado, sob agitação constante e, nas mesmas condições que a síntese dos derivados descritas na secção 2,4, Cy3glc, ácido gordo e solvente foram adicionados. A reação foi iniciada aquando a adição da amostra de enzima liofilizada (0,13 mg), que ocorreu a 60 °C. A deteção de produto determinada através da análise por HPLC-DAD.

III. Resultados e Discussão

3.1. Obtenção de extratos de antocianinas

3.1.1. Caracterização dos extratos por HPLC e LC-MS

Os extratos obtidos do vinho e da amora foram analisados por HPLC-DAD e por LC-MS, de modo a caracterizar os extratos e verificar a sua pureza (Figura 3.1).

O extrato obtido através do vinho tinto possuía como pigmento maioritário a Mv3glc (**I**), sendo detetado, com menor intensidade, as antocianinas delfinidina-3-glucósido, Dp3glc (**III**), a petunidina-3-glucósido, Pt3glc (**IV**) e a peonidina-3-glucósido, Pn3glc (**V**) (Figura 3.1 a). No extrato das amoras apenas foram observadas antocianinas derivadas da cianidina, sendo a maioritária a cianidina-3-glucósido, Cy3glc (**II**). As restantes antocianinas provenientes das amoras foram a cianidina-3-rutinósido, Cy3rut (**VI**), a cianidina-3-dioxaloil-glucósido, Cy3dioxaglc (**VII**), e a cianidina-3-malonil-glucósido, Cy3manglc (**VIII**) (Figura 3.1 b).

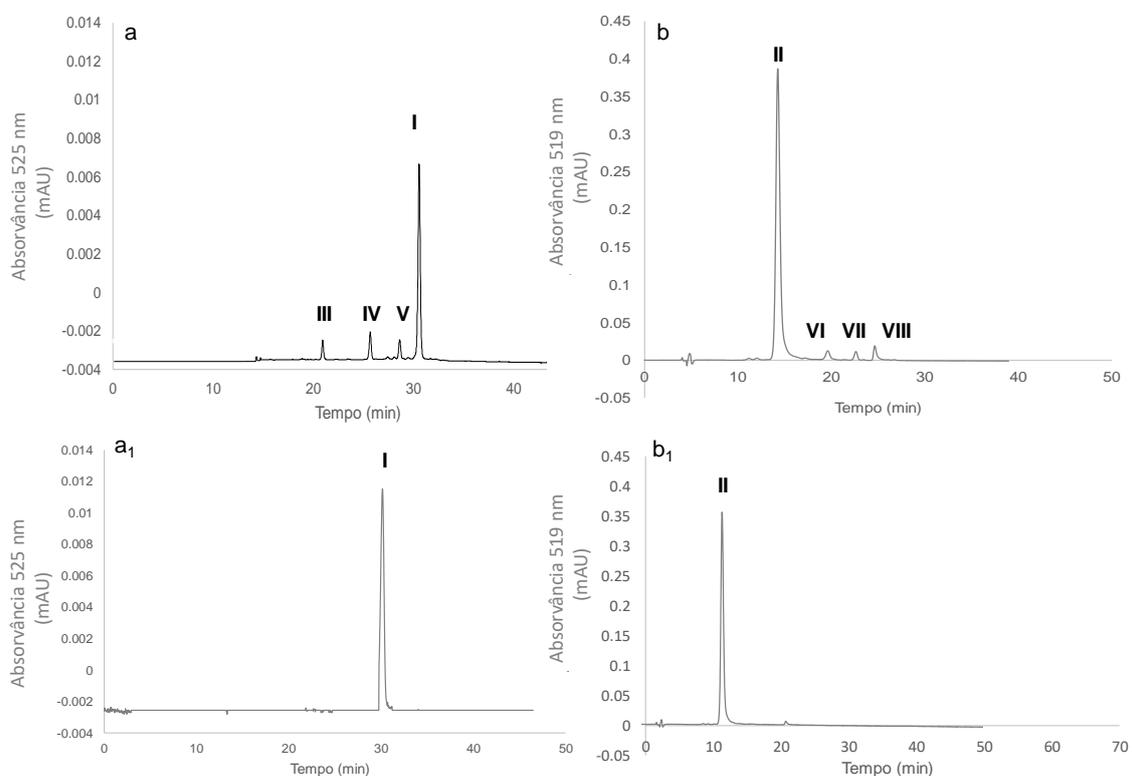


Figura 3.1. Identificação cromatográfica por HPLC-DAD e por MS/ESI das antocianinas presentes no extrato obtido através do vinho (**a**) e a sua antocianina maioritária (**a₁**) e da amora (**b**) e o seu pigmento principal (**b₁**). I – Mv3glc (malvidina-3-O-glucósido); III – Dp3glc (delfinidina-3-O-glucósido); IV – Pt3glc (petunidina-3-O-glucósido); V – Pn3glc (peonidina-3-O-glucósido); II – Cy3glc (cianidina-3-O-glucósido); VI – Cy3rut (Cianidina-3-rutinósido); VII – Cy3dioxaglc (Cianidina-3-dioxaloil-glucósido); e VIII - Cy3manglc (Cianidina-3-malonil-glucósido).

As antocianinas maioritárias foram isoladas e a sua pureza foi analisada por HPLC-DAD, obtendo um grau de pureza de 85 % e de 98 % para a Mv3glc e para a Cy3glc, respetivamente. Os dados de massa de todas as antocianinas identificadas (Figura 3.2) estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Caracterização estrutural das antocianinas presentes no extrato de vinho e da amora.

Amostra	[M] ⁺ m/z	MS ² m/z
Vinho		
Dp3glc	465	303
Pt3glc	479	317
Pn3glc	463	301
Mv3glc	493	331
Amora		
Cy3glc	449	287
Cy3rut	595	287
Cy3dioxglc	593	287
Cy3manglc	535	287

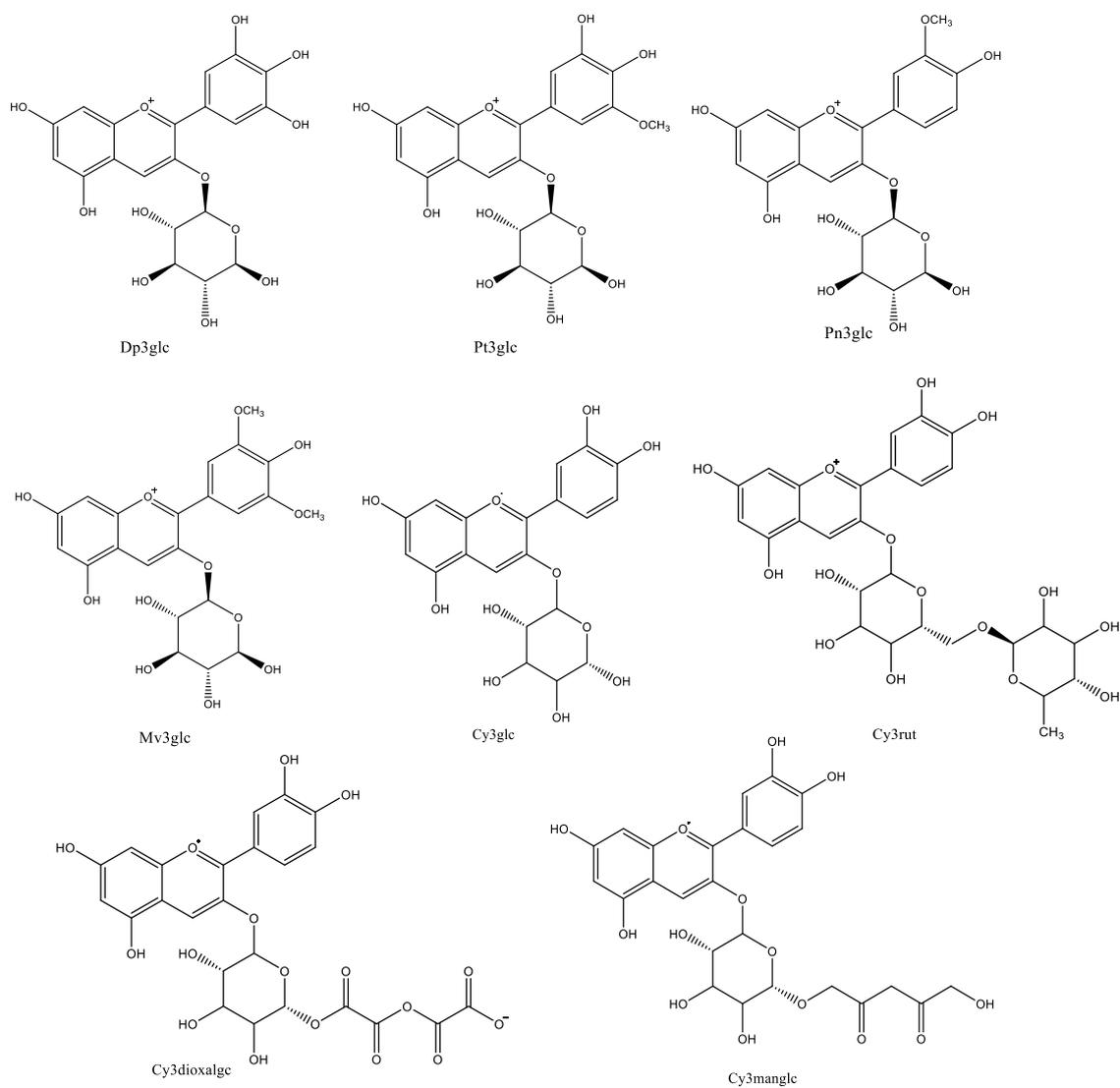


Figura 3.2. Estruturas químicas dos pigmentos antocianínicos identificados nos extratos do vinho e da amora.

3.1.2. Síntese dos derivados lipofílicos da Mv3glc e da Cy3glc

A catálise enzimática depende de vários fatores; nomeadamente do dador acilo, da temperatura, do solvente, da quantidade de água presente no sistema e da quantidade de enzima utilizada. De modo a otimizar a síntese dos derivados lipofílicos, foram estudadas algumas destas variáveis na formação do derivado Cy3glc-C8 (Tabela 3.2). Todas as reações foram realizadas utilizando 2,67 g/mL de Cy3glc. As reações com acetona, R1, resultaram apenas na degradação da antocianina, não tendo sido detetado produto. As reações com os solventes 2-Me-2-Bu, R3, e acetonitrilo, R2, resultaram na formação de éster, sendo que o rendimento foi superior para R3 (40 %). O solvente utilizado nas reações não pode provocar a desnaturação da enzima, como acontece quando a enzima entra em contato com solventes polares como o THF e DMSO, e deve solubilizar tanto a antocianina precursora como o éster formado. Dos solventes estudados, o 2-Me-2-Bu foi escolhido como o ótimo para a produção de derivados lipofílicos, pois não degradou a enzima ou a antocianina, atingindo os melhores rendimentos do produto.

A influência do dador acilo foi estudada nas reações R3-R7. Verificou-se que o rendimento da reação foi máximo quando o número de moles adicionado foi de 100 eq. de C8. O estudo da variação da quantidade de ácido gordo demonstrou uma relação linear entre o aumento da concentração de ácido gordo e os rendimentos obtidos, até à adição do número de moles ótimo do dador acilo (100 eq.).

A esterificação das antocianinas é caracterizada pela libertação de água como subproduto, dependendo de um balanço delicado de concentração de água no meio reacional. Se a concentração de água for muito elevada a reação tende a ocorrer no sentido inverso, ocorrendo a hidrólise dos ésteres. Por outro lado, encontra-se descrito que a presença de água no meio reacional (1-2 %) aumenta os rendimentos das sínteses¹²⁴. O controlo da quantidade de água foi efetuado através do uso de filtros moleculares, que absorvem o excesso de água libertado durante a reação. Assim, nas reações R8-R10 foi observado que a quantidade de filtros moleculares ótima para a enzima atuar foi de 100 g/L, sem, no entanto, influenciar negativamente a formação do derivado Cy3glc-C8.

Tabela 3.2. Estudo das variáveis da síntese enzimática de Cy3glc-C8

Reações	MS4Å	Solvente	Dador acilo eq.	η (%)
R1	100	Acetona	100	0
R2	100	CH ₃ CN	100	20
R3	100	2-Me-2-Bu	100	40

R4	100	2-Me-2-Bu	200	39
R5	100	2-Me-2-Bu	75	25
R6	100	2-Me-2-Bu	50	20
R7	100	2-Me-2-Bu	150	39
R8	200	2-Me-2-Bu	100	25
R9	50	2-Me-2-Bu	100	15
R10	150	2-Me-2-Bu	100	18

As sínteses dos derivados lipofílicos da Mv3glc e da Cy3glc ocorreram a 60 °C, com a antocianina e o ácido gordo (100 eq) dissolvidos em 2-metil-2-butanol anidro com filtros moleculares, previamente ativados (100 g/L). A síntese ocorreu na presença de um biocatalisador, a lipase B da *Candida antarctica*, sendo que a reação se iniciou aquando a adição de CalB (20 g/L).

Foram sintetizados sete derivados lipofílicos de Mv3glc (**2-8**), usando como dadores acilo os ácidos desde o ácido butírico (C4), o hexanóico (C6), o octanóico (C8), o caprílico (C10), o láurico (C12), o mirístico (C14) até ao ácido palmítico (C16) (Figura 3.3).

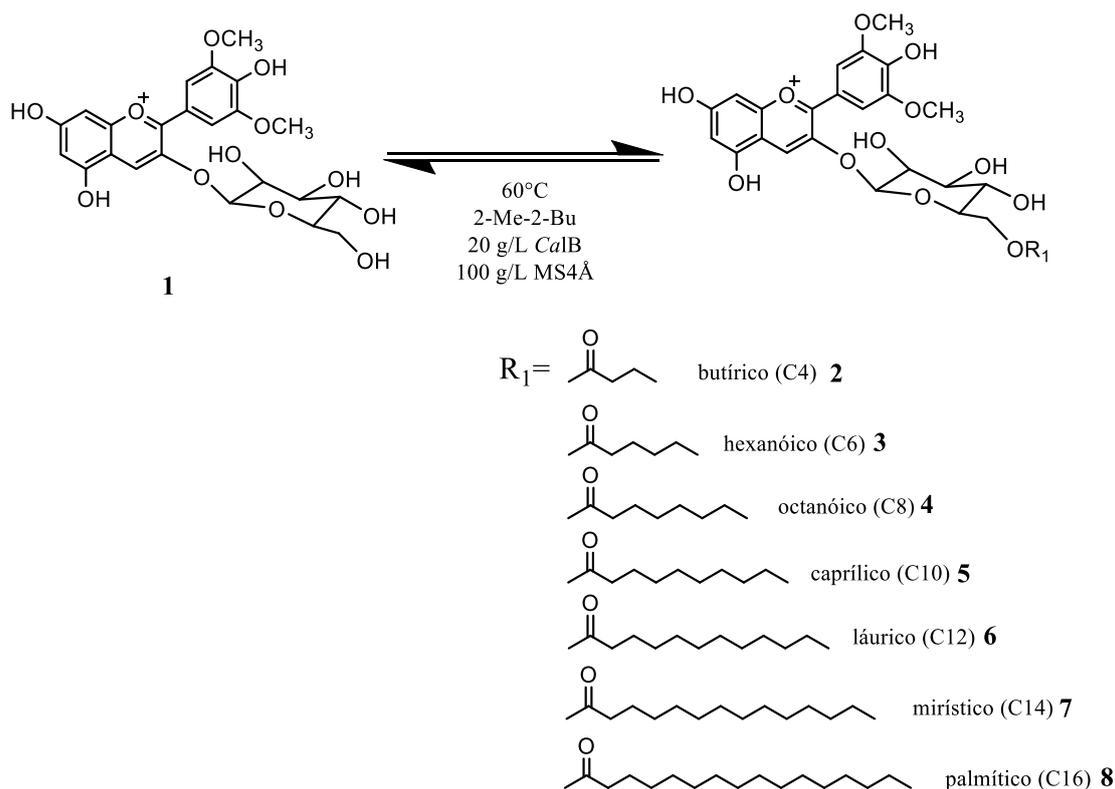


Figura 3.3. Esquema da esterificação enzimática de Mv3glc com os diferentes dadores acilo, usando como catalisador a enzima CalB.

As reações foram monitorizadas por HPLC-DAD tendo sido identificados apenas o pico da antocianina a esterificar e de um novo pico, referente à formação do derivado acilado (Figura 3.4), posteriormente confirmado através da análise LC-MS. A formação do éster teve início ao fim de 2 h de reação, em todas as sínteses. Através da análise

HPLC-DAD foi possível observar a influência do dador acilo na polaridade dos derivados. Os tempos de retenção, indicadores da polaridade dos compostos, são superiores para os compostos derivados, comparativamente à antocianina precursora. Deste modo, verificou-se que a adição do ácido gordo resultou numa diminuição da polaridade da antocianina. Foi também possível observar uma relação direta entre o tamanho do ácido gordo e a polaridade do composto. Os tempos de retenção, e consequentemente a lipofilicidade, aumenta com o aumento da cadeia do ácido gordo adicionada à antocianina.

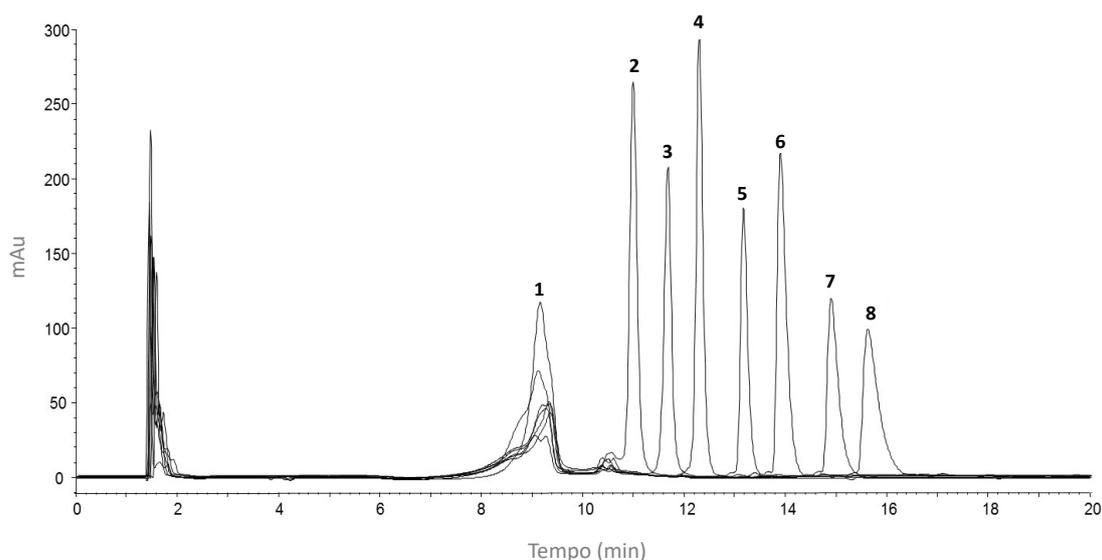


Figura 3.4. Cromatogramas sobrepostos das reações enzimáticas, obtidos ao comprimento de onda máximo e representativos da conversão máxima de cada derivado acilado de Mv3glc.

A síntese dos derivados acilados de Cy3glc (Figura 3.5) ocorreram utilizando os ácidos gordos desde o ácido butírico (C4) até ao ácido láurico (C12).

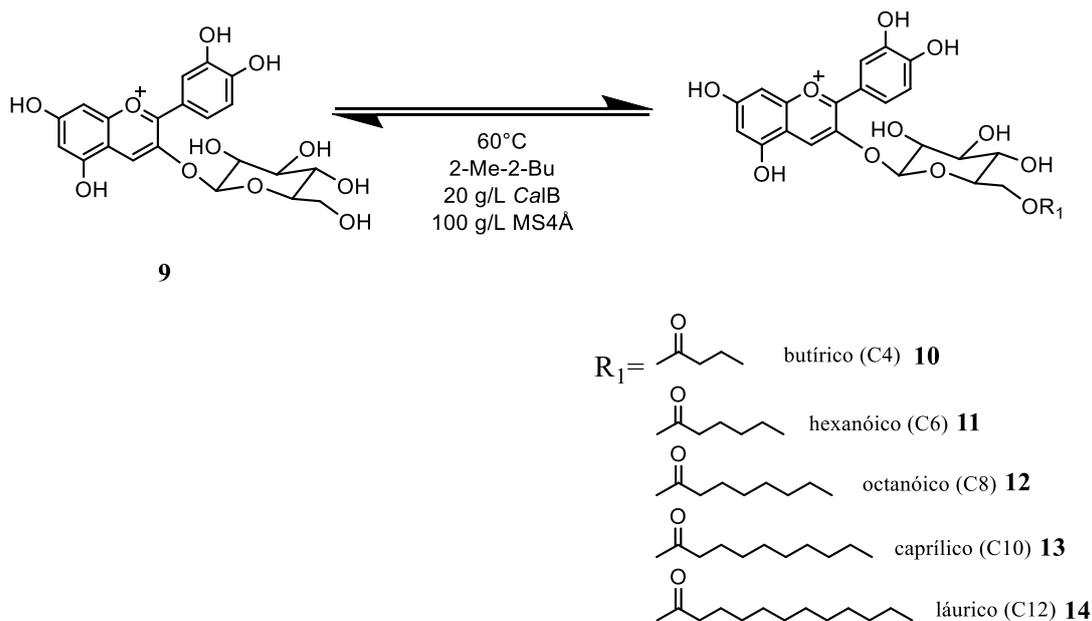


Figura 3.5. Esquema da esterificação enzimática de Cy3glc com os diferentes dados acilo, usando como catalisador a enzima CalB.

As reações ocorreram sob as mesmas condições que os derivados lipídicos de Mv3glc. A formação do produto esterificado foi detetado após 2 h de reação, tal como foi observado na síntese dos derivados acilados de Mv3glc. Como sucedeu com os derivados acilados de Mv3glc, o tamanho da cadeia lipídica do ácido influenciou a polaridade do composto. A lipofilicidade dos derivados de Cy3glc aumentou com o tamanho da cadeia carbonada do ácido gordo ligado covalentemente à antocianina (Figura 3.6).

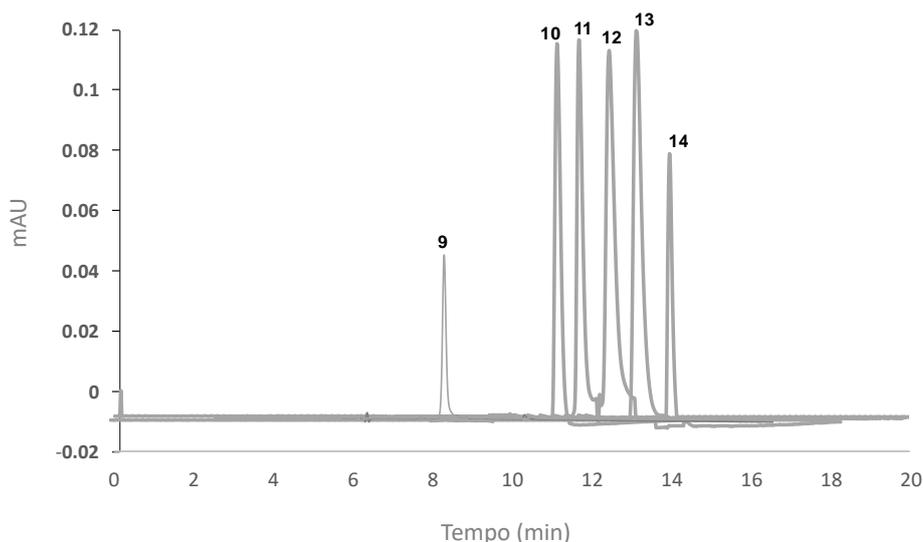


Figura 3.6. Cromatogramas sobrepostos dos derivados acilados de Cy3glc e seu precursor, obtidos ao comprimento de onda máximo de pigmento.

O aumento da lipofilicidade dos compostos esterificados foi observada por análise cromatográfica HPLC-DAD, assim como durante a purificação por coluna de

vidro por cromatografia flash (Figura 3.7). A antocianina que não reagiu foi eluída com uma solução aquosa de 30 % de MeOH com 0,01 M de HCl, enquanto que os produtos esterificados apenas foram eluídos com 50-70 % de MeOH com 0,01 M de HCl, dependendo do tamanho da cadeia carbonada do derivado acilado. Os ésteres com cadeias carbonadas mais curtas (Cy-C4) foram eluídos com 50% de MeOH acidulado enquanto que derivados acilados com a cadeia carbonada mais longa, como Cy-C10 e Cy-C12, sendo mais lipofílicos, foram eluídos com 70 % de MeOH acidulado.

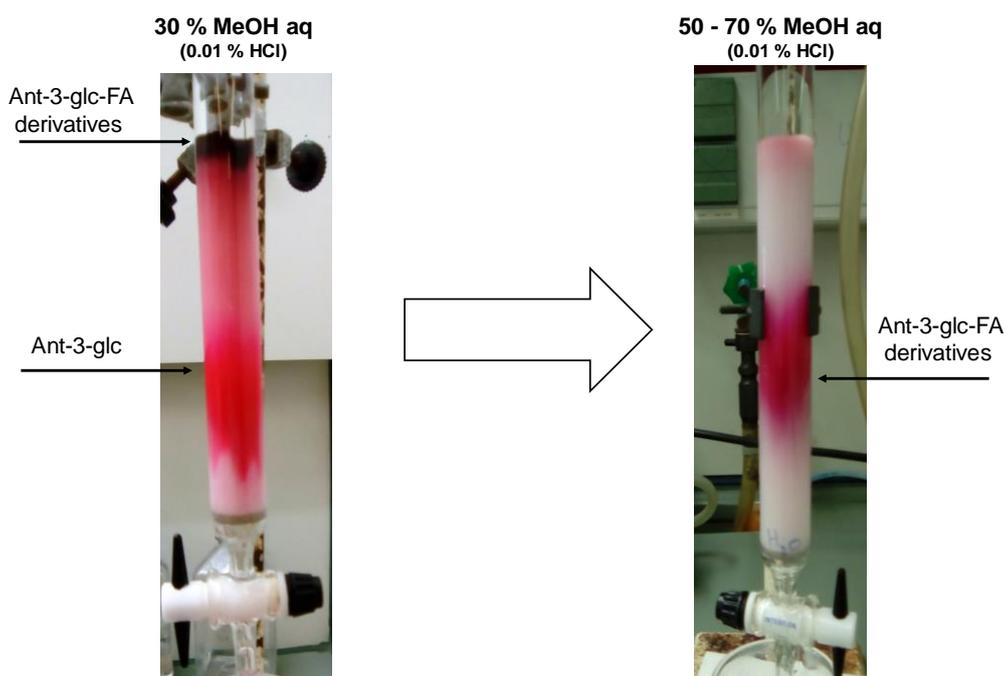


Figura 3.7. Isolamento dos pigmentos acilados derivados de Mv3glc e Cy3glc por cromatografia flash com sílica de fase reversa C18.

Os rendimentos das reações foram calculados após isolamento e liofilização do éster formado (Tabela 3.3). Os pigmentos acilados que se obtiveram em menor quantidade foram o Mv3glc-C14 (**7**) e Mv3glc-C16 (**8**). A velocidade da acilação é influenciada pelas características do dador acilo, nomeadamente o tamanho da sua cadeia carbonada⁷⁹. Após o processo de imobilização, vários estudos mostram um melhoramento da atividade das enzimas, sendo que estas atuam maioritariamente na interface de emulsões, como é o caso de CalB. Uma vez que a reação ocorre no centro ativo do biocatalisador, a eficiência desta pode ser limitada à dificuldade do dador acilo atingir o centro ativo de CalB, apesar de ser utilizado como solvente um álcool terciário e não uma mistura coloidal. Os derivados acilados com a cadeia carbonada mais curta atingiram mais rapidamente o tempo de conversão máxima do que os pigmentos com a cadeia carbonada mais comprida. Assim, os derivados Mv3glc-C4 e Cy3glc-C4

(derivados **2** e **10**, respetivamente) atingiram a conversão máxima ao fim de 6 h, enquanto que para os pigmentos acilados com cadeias carbonadas mais longas demorou cerca de 12 h.

O comprimento de onda máximo de cada composto acilado foi determinado através da análise do espetro de absorção obtido por HPLC-DAD. Através da análise por HPLC-DAD foi possível observar que o comprimento de onda máximo dos derivados sintetizados manteve-se na zona visível, sendo que os seus espetros sofreram pequenos desvios batocromáticos, comparativamente à antocianina precursora.

Tabela 3.3. Dados de espetrometria de UV-Vis, tempos de retenção de HPLC-DAD e rendimentos obtidos dos derivados lipofílicos e seus respetivos precursores.

Composto	M.W Cl⁻	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Tempo de conversão máximo (h)	Tr (min)	η^a (%)
Mv3glc (1)	528	525	-	9	-
Mv3glc-C4 (2)	598	530	6	11.0	40
Mv3glc-C6 (3)	626	533	9	11.8	37
Mv3glc-C8 (4)	654	535	9	12.4	40
Mv3glc-C10 (5)	683	536	12	13.2	30
Mv3glc-C12 (6)	710	537	12	13.9	35
Mv3glc-C14 (7)	739	537	12	14.9	24
Mv3glc-C16 (8)	767	537	12	15.7	22
Cy3glc (9)	485	519	-	8.9	-
Cy3glc-C4 (10)	555	520	6	10.9	47
Cy3glc-C6 (11)	583	520	9	11.8	40
Cy3glc-C8 (12)	611	525	9	12.5	40
Cy3gc-C10 (13)	639	530	12	13.4	30
Cy3glc-C12 (14)	667	541	12	14.2	25

^aapós o isolamento do derivado acilado

3.2. Caracterização estrutural dos derivados de Mv3glc e Cy3glc

3.2.1. LC-MS/ESI

A caracterização estrutural dos compostos sintetizados, após o seu isolamento, foi efetuada por análise por espectrometria de massa e por análise RMN.

A análise do ião molecular correspondente à massa molecular do composto sintetizado, por LC-DAD/ESI-MS em modo positivo, confirmou que a acilação ocorreu na molécula de açúcar (Tabela 3.4). De facto, através dos fragmentos MS² foi possível comprovar a ligação covalente do ácido gordo ao resíduo de glucose da antocianina (Figura 3.8).

Tabela 3.4. Fragmentações e tempos de retenção obtidos dos espectros de massa dos derivados acilados sintetizados e seus respetivos precursores

Composto	Tr (min)	[M ⁺] m/z	MS ²	MS ³
Mv3glc e seus derivados				
1	9	493	331(-162)	315 (-162-16)
2	11,0	563	331 (-232)	315 (-232-16)
3	11,8	591	331 (-260)	315 (-260-16)
4	12,4	619	331 (-288)	315 (-288-16)
5	13,2	648	331 (-316)	315 (-316-16)
6	13,9	675	331 (-344)	315 (-344-16)
7	14,9	703	331 (-372)	315 (-372-16)
8	15,7	731	331 (-400)	315 (-400-16)
Cy3glc e seus derivados				
9	8,9	449	287 (-162)	- ^a
10	10,9	519	287 (-232)	- ^a
11	11,8	547	287 (-260)	- ^a
12	12,5	576	287 (-288)	- ^a
13	13,4	603	287 (-316)	- ^a
14	14,2	631	287 (-344)	- ^a

^afragmentação não detetada

Para os derivados de Mv3glc foi possível observar uma terceira fragmentação, [MS²-16] a 315 *m/z*, referente à libertação de um grupo metilo do anel B. Uma vez que, a enzima CalB está descrita como sendo um catalisador seletivo para alcoóis primários, na reação de esterificação, observou-se, de facto, a formação de apenas um monoéster⁹⁵.

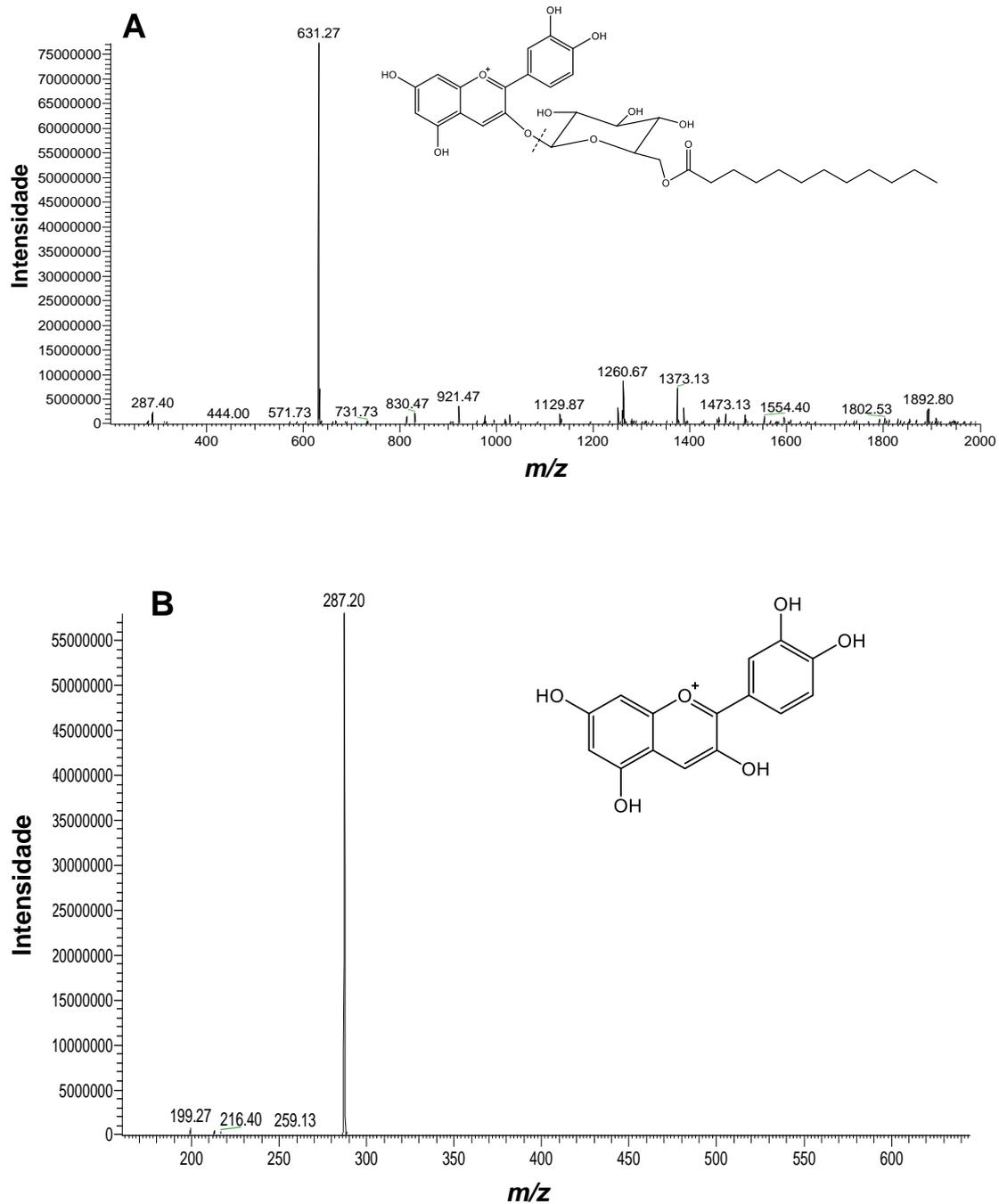


Figura 3.8. Espectro de massa do derivado acilado **14** obtidos por análise LC-DAD/ESI-MS, sendo (A) o espectro Full MS e (B) o espectro da primeira fragmentação (MS^2).

3.2.2. Caracterização dos derivados por RMN

De modo a elucidar a estrutura dos pigmentos acilados de Mv3glc e de Cy3glc, foi realizada a análise por RMN. Uma vez que a síntese dos vários pigmentos foi efetuada modificando a antocianina do mesmo modo, apenas foi analisado um derivado lipofílico, o pigmento Cy3glc-C12. Na literatura, já se encontra descrito a caracterização da estrutura do derivado de Mv3glc com o ácido oleico, que demonstrou a ligação da cadeia alifática ao carbono 6'' do açúcar¹¹⁹. Através da análise do derivado acilado foi possível confirmar o mesmo efeito, não tendo sido detetado mais nenhum resíduo carbonado ligado à estrutura da antocianina. O local de acilação foi confirmado comparando os desvios químicos dos prótons e dos carbonos de Cy3glc-C12 com os de Cy3glc e de Mv3glc-C18 já publicados.

Os desvios de RMN de Cy3glc-C12 (**14**) (Figura 3.9), dissolvido em DMSO/TFA (9:1), estão representados na Tabela 4.2. Os desvios químicos dos prótons e dos carbonos do pigmento acilado foram atribuídos usando técnicas de RMN 1D e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

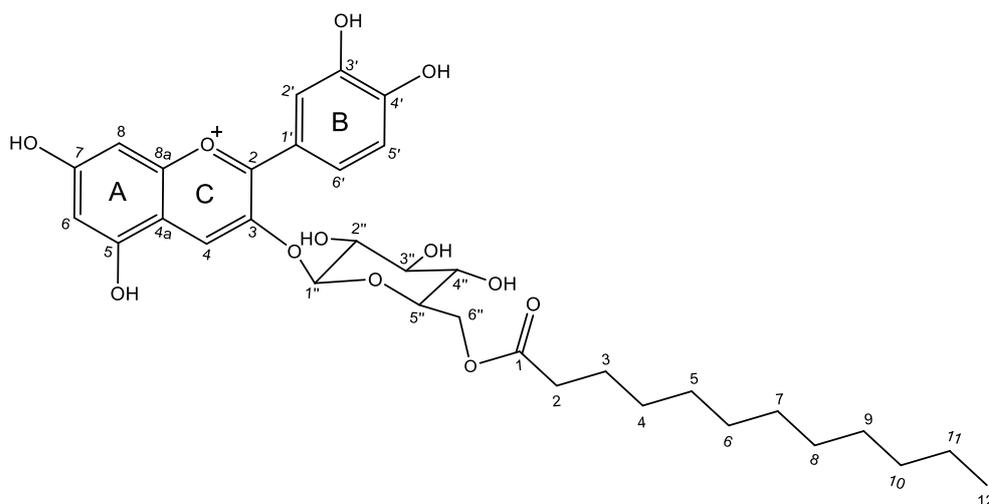


Figura 3.9. Estrutura química do derivado lipofílico Cy3glc-C12.

Tabela 3.5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Cy3glc-C12 em DMSO/TFA (9:1)

Posição	δ ^1H ; J (Hz)	δ (^{13}C)	HMBC	HSQC
2C	-	162,0	H-4C, H-2'B, H-6'B	-
3C	-	144,0	H-4C	-
4C	8,79; s	134,0	-	H-4C
4aA	-	112,0	H-6 ^a	-
5A	-	159,0	H-4C	-
6A	6,70; d, 2,00	101,8	-	H-6 ^a
7A	-	168,3	H-6A, H-8A	-
8aA	-	156,1	H-4C	-
8A	6,89; d, 2,00	94,6	-	H-8 ^a
1'B	-	118,3	H-2'B, H-6'B	-
2'B	7,97; d, 2,35	118,2	-	H-2'B, H-6'B
3'B	-	146,3	H-2'B, H-6'B	-
4'B	-	155,0	H-2'B, H-6'B	-
5'B	7,01; dd, */8,71	116,1	H-2'B, H-6'B	-
6'B	8,20; dd, 2,35/8,71	127,4	-	H-6'B
Glucose				
1''	5,39; d 7,33	101,6	-	H-1''
2''	3,51; dd, */7,33	73,2	-	H-2''
3''	3,39; d*	76,1	-	H-3''
4''	3,21; m	70,1	-	H-4''
5''	3,77	74,9	-	H-5''
6''a	4,06;	63,7	-	H-6''a
6''b	4,32;	63,7	-	H-6''b
Ácido láurico				
1	-	173,3	H-6''a	-
2	2,22	33,0	H-6''a	-
3	1,37	29,0	-	H-3
4-10	1,21	30,0	H-4 – H-7	-
11	1,13	24,9	-	H-11
12	0,81; t	14,0	-	H-12

*não resolvido, s, singleto, d, duplete, dd, duplo duplete, t, tripleto, m, multiplete

Os prótons dos anéis A, B e C foram atribuídos através das correlações observadas no espectro COSY (Figura 3.10). Assim, os prótons H-6'B e H-5'B foram atribuídos aos respetivos duplos dupletos assim como o próton H-4C foi atribuído ao singleto e aos prótons H-6A, H-8A e H-2'B os respetivos dupletos.

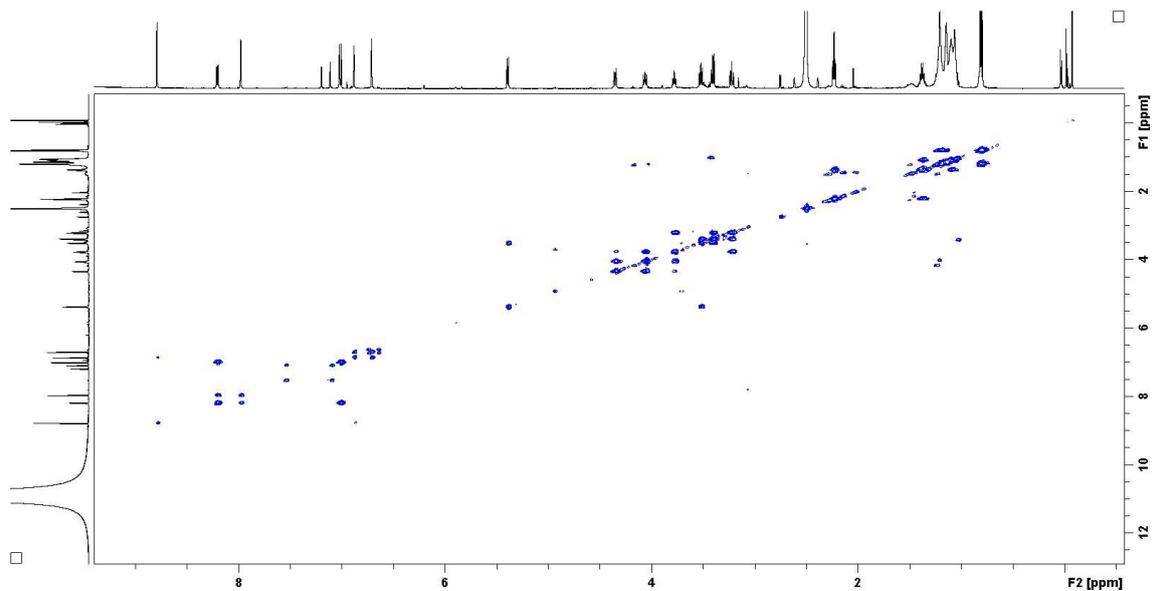


Figura 3.10. Espectro COSY de Cy3glc-C12

A ligação do grupo carbonilo do ácido gordo ao protão terminal do resíduo de glucose da antocianina foi observada pelos espectros bidimensionais HMBC (Figura 3.11) e HSQC (Figura 3.12), tendo sido identificadas correlações entre o C-2 do ácido gordo e os protões H-6''a da Cy3glc. Na literatura, o carbono C-6'' da Cy3glc é identificado, possuindo um desvio químico de, aproximadamente, 60 ppm¹²⁵. Na presença de ácido gordo o desvio químico de C-6'' foi desviado para 63,7 ppm.

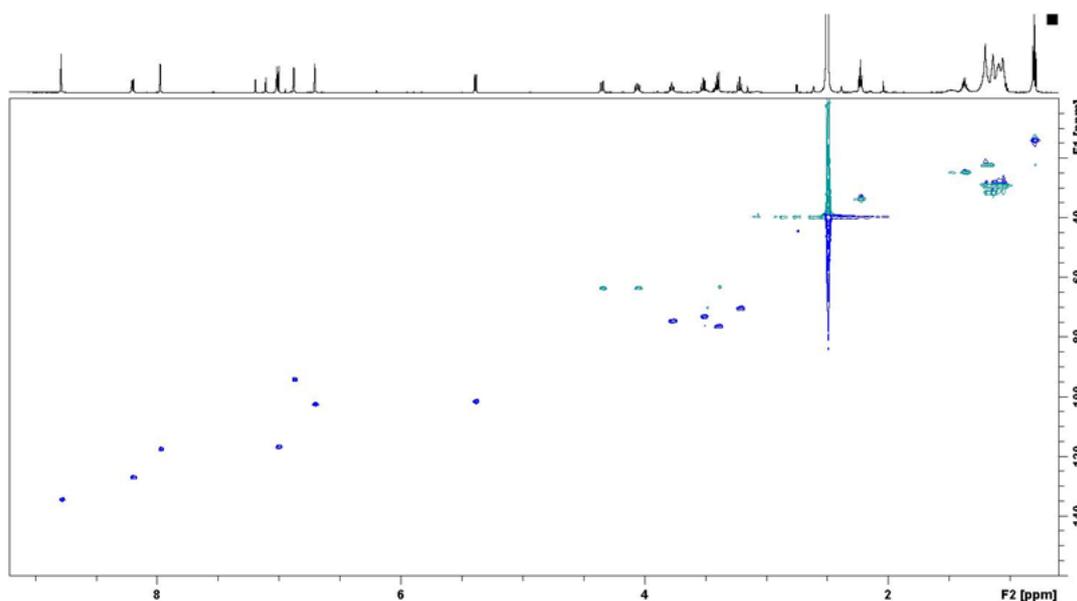


Figura 3.11. Espectro 2D de HSQC de Cy3glc-C12

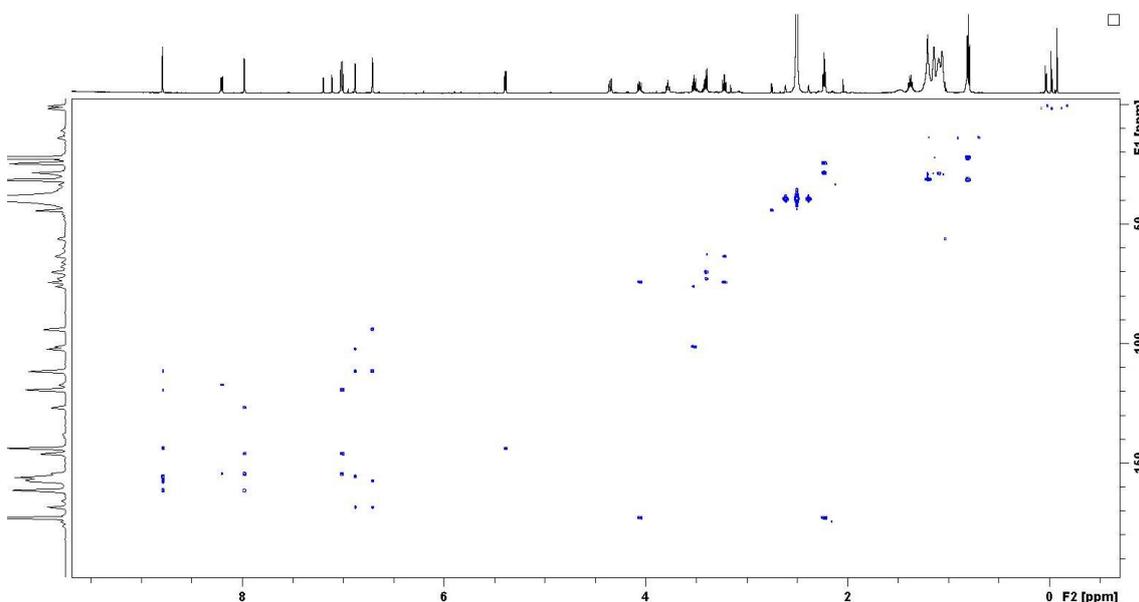


Figura 3.12. Espectro 2D de HMBC de Cy3glc-C12.

3.2.3. Parâmetros de lipofilicidade

Com o intuito de estudar a lipofilicidade dos compostos, foram determinados o coeficiente de partição (Log P) e o índice de hidrofobicidade (R_m).

Os valores de Log P foram determinados teórica e experimentalmente, através da análise por HPLC-DAD da distribuição dos compostos pelo sistema bifásico octanol/água. Os valores de R_m foram obtidos tendo por base os valores de R_f calculados por TLC dos pigmentos acilados e das antocianinas não modificadas (Tabela 3.6). Foi possível observar uma relação direta entre os parâmetros de lipofilicidade e do tamanho da cadeia lipídica. Os valores de Log P, assim como os valores de R_m , aumentam há medida que a cadeia carbonada aumenta, indicando que a lipofilicidade

dos compostos sintetizados é superior à antocianina precursora. Pode-se então afirmar que a esterificação aumentou a solubilidade destes compostos em meios lipídicos. Os valores de Log P teóricos e experimentais seguem a mesma tendência, ou seja, o valor de Log P aumentou com o aumento da cadeia de ácido gordo, apesar de terem diferentes ordens de grandeza. Os valores dos Log P dos derivados de Mv3glc mais lipofílicos (desde o Mv3glc-C12 (**6**) até ao Mv3glc-C16 (**8**)) não foram determinados pelo facto de não terem sido detetados na fase aquosa.

Tabela 3.6. Propriedades físico-químicas dos derivados lipofílicos e seus respetivos precursores referentes à lipofilicidade

Composto	R _f	R _m	Log P teóricos*	Log P exp
1	0,87 ^a	-0,83	-2,47	-1,31
2	0,85 ^a	-0,75	-0,85	0,56
3	0,83 ^a	-0,69	0,17	1,30
4	0,80 ^a	-0,60	1,18	2,04
5	0,73 ^a	-0,43	2,19	2,77
6	0,63 ^a	-0,23	3,20	-
7	0,51 ^a	-0,02	4,21	-
8	0,39 ^a	0,19	5,22	-
9	0,90 ^b	-0,95	-3,09	-2,09
10	0,71 ^b	-0,39	-0,83	-0,25
11	0,58 ^b	-0,14	0,16	0,95
12	0,37 ^b	0,23	1,17	1,66
13	0,15 ^b	0,75	2,18	2,35
14	0,05 ^b	1,28	3,38	3,00

^adeterminado através de TLC usando o eluente a solução aquosa de acetonitrilo/ácido acético/água (1:40:8)

^bdeterminado através de TLC usando o eluente a solução aquosa de 70% de MeOH

*valores calculados através do software de Molinspiration¹²¹

3.2.4. Estudo cromático dos derivados lipofílicos sintetizados da Mv3glc e da Cy3glc

As antocianinas possuem elevada capacidade corante que, aliada às suas características biológicas benéficas ao organismo, torna estas moléculas ideais para aplicações tecnológicas. Deste modo, foi estudada a influência do ácido gordo nas características cromáticas da antocianina.

3.2.5. Estudo cinético da degradação térmica

A acilação das antocianinas com ácidos gordos saturados está descrita que modifica a sua polaridade, tornando estas moléculas solúveis em matrizes lipídicas¹²⁶. Deste modo, e tendo em perspetiva futuras aplicações destes pigmentos, o estudo das características cromáticas dos derivados e da antocianina precursora foram realizados num meio que mimetiza as características de uma matriz lipídica. O meio utilizado, uma solução aquosa de dodecil sulfato de sódio, SDS, garantiu a solubilização total de todos os compostos a avaliar. Sendo uma molécula anfifílica, o SDS tem a capacidade de formar agregados (micelas) acima da concentração micelar crítica, CMC, e por isso é considerado um tensoativo¹²⁷ (Figura 3.13).

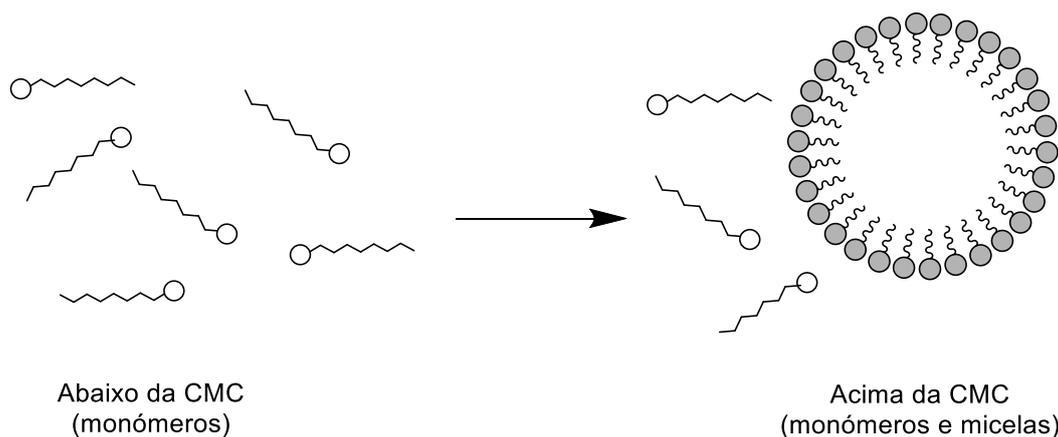


Figura 3.13. Formação do agregado micelar.

A influência do surfactante foi já descrita, para dois dos derivados acilados (Mv3glc-C6 e Mv3glc-C12), assim como da antocianina precursora. A solução com SDS aquosa provocou um aumento da estabilidade do catião flavílio, aumentando o $pK'a$ em 0,3 unidades. Também foi observado que a espécie quinoidal dos derivados acilados encontrava-se mais estabilizada a pH neutro, comparativamente com a Mv3glc, comprovando a estabilidade da cor azul criada pelo emulsionante^{69, 72}.

Os ensaios preliminares da evolução da cor dos derivados lipofílicos de Cy3glc, assim como do seu precursor, decorreram ao longo de 9 dias à temperatura ambiente a diferentes pH's (3, 5 e 7). A cor das soluções das amostras é influenciada pelas espécies antociânicas presentes na solução aquosa de SDS aos diferentes valores de pH. Deste modo, e tendo por base a determinação das frações molares de Mv3glc, Mv3glc-C6 e Mv3glc-C12 descrito na literatura⁷², podemos assumir que a pH 3 a cor das soluções é influenciada apenas pelo catião flavílio, sendo esta espécie a predominante na solução. A pH 5, a distribuição das frações molares de Mv3glc é de 70 % de catião flavílio, sendo os restantes 30 % uma mistura de chalconas (Ct e Cc), hemiacetal e base quinoidal neutra, enquanto que para os seus derivados lipofílicos o catião flavílio é a espécie predominante (90 %), sendo os restantes 10 % uma mistura das espécies A, B Ct e Cc. A pH 7 a concentração do catião flavílio é residual, na solução de Cy3glc aquoso, sendo as espécies predominantes Ct (60 %), A (20 %) e B e Cc (15 %), no entanto, a cor dos pigmentos acilados é obtida principalmente pela espécie quinoidal neutra A (em equilíbrio encontra-se cerca de 50 %) com 20 % de B e Cc e 10 % Ct. Através da Figura 3.14 foi possível observar a intensidade da absorvância das amostras no comprimento de onda máximo de cada pigmento aos valores de pH 3, 5 e 7 para a Cy3glc (**9**) e seus derivados acilados (**10-14**) ao longo do tempo.

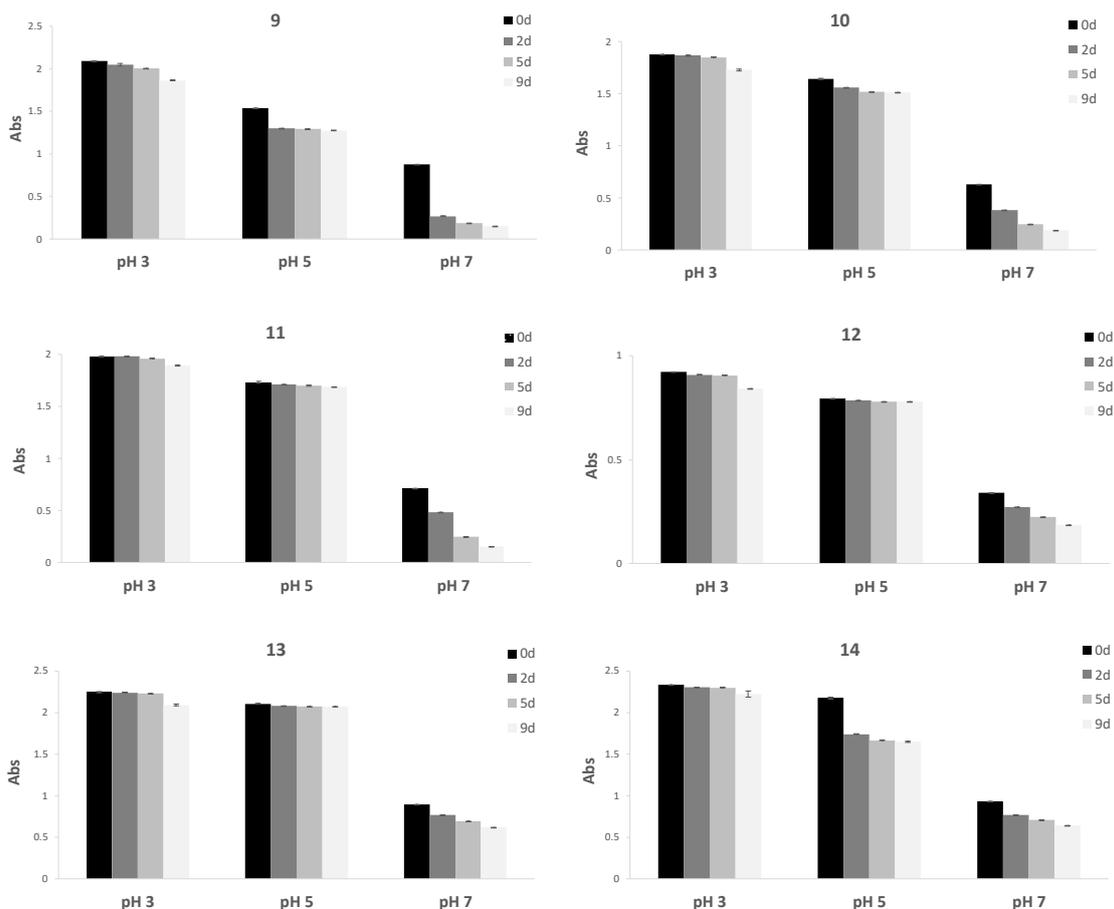


Figura 3.14. Evolução da degradação da absorvância de Cy3glc e os seus derivados lipofílicos sintetizados no seu respetivo comprimento de onda máximo, em soluções aquosas de SDS 0,1 M à temperatura ambiente a diferentes valores de pH

A pH 3 não foram observadas diferenças significativas na intensidade da cor entre as soluções dos derivados lipofílicos e a da Cy3glc. A pH 5, o pigmento mais estável, Cy3glc-C10 (**13**) perdeu apenas 2 % da sua absorvância inicial a 535 nm após 9 dias, comparativamente à antocianina não modificada, cuja absorvância diminuiu cerca de 17 %. As maiores diferenças entre os derivados acilados sintetizados e a antocianina precursora foram observadas a pH 7. Os pigmentos mais lipofílicos, Cy3glc-C10 e Cy3glc-C12, exibem cores azul-violeta a pH neutro, devido à presença da base quinoidal, a espécie predominante. A solução de Cy3glc perdeu cerca de 83 % da sua cor inicial, tornando-se amarela após 9 dias de armazenamento enquanto que Cy3glc-C10 perdeu 31 % da sua cor inicial, continuando a exibir tonalidades azuis-arroxeadas. Após nove dias de armazenamento a pH 7, os espetros de absorção de Cy3glc-C10 evidenciaram maior intensidade, comparativamente à Cy3glc (Figura 3.15).

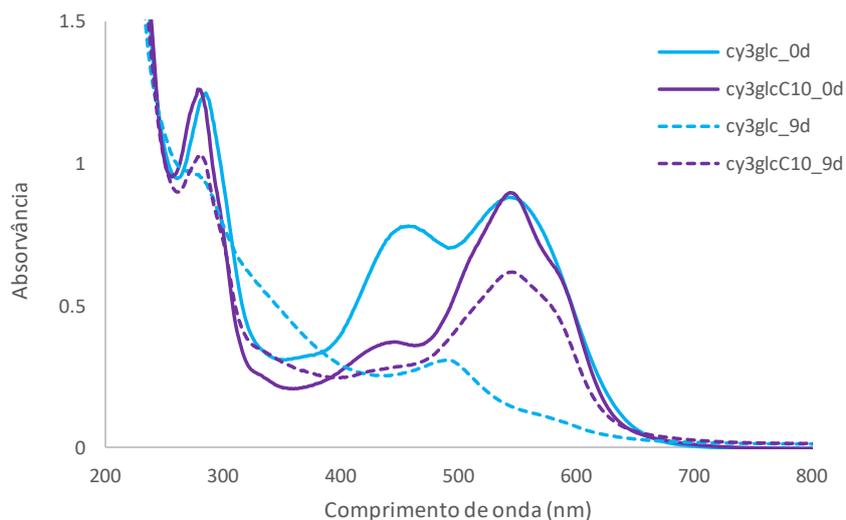


Figura 3.15. Espectro UV-Vis de Cy3glc e Cy3glc-C10 em SDS 0.1 M aquoso a pH 7, no início e após 9 dias de equilíbrio.

Os parâmetros cinéticos da degradação térmica foram determinados de modo a estudar a influência da acilação alifática na estabilidade da cor de Cy3glc. Os parâmetros cinéticos foram determinados a diferentes temperaturas (65, 80 e 95 °C) para os diferentes valores de pH estudados. Os parâmetros cinéticos, nomeadamente o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), a constante da cinética da degradação térmica (k) e a energia de ativação, E_a calculados, encontram-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Parâmetros cinéticos da degradação térmica de Cy3glc (9) e seus derivados lipofílicos (10-14) em solução SDS aquosa

Composto	T (°C)	pH 3			pH 5			pH 7		
		k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	E_a • (kJ.mol ⁻¹)	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	E_a • (kJ.mol ⁻¹)	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	E_a • (kJ.mol ⁻¹)
1	65	0,0776±0,0182	9,23±1,92	52,50±	0,1497±0,0059	4,64±0,18	28,95±	0,1788±0,0177	3,90±0,37	22,77±
	80	0,2100±0,0030	3,30±0,05	6,70 ^a	0,2100±0,0030	3,30±0,05	1,69 ^a	0,2921±0,0341	2,39±0,26	3,51 ^a
	95	0,3473±0,0112	2,00±0,06		0,3473±0,0112	2,00±0,06		0,3434±0,0050	2,02±0,03	
2	65	0,0746±0,0006	9,29±0,08	36,37±	0,0991±0,0017	7,00±0,12	12,04±	0,1121±0,0031	6,19±0,17	32,12±
	80	0,1404±0,0021	4,94±0,07	0,84 ^b	0,1188±0,0099	5,86±0,51	1,36 ^{b,c,d}	0,2343±0,0153	2,97±0,19	3,32 ^{b,e}
	95	0,2137±0,0033	3,24±0,05		0,1405±0,0036	4,94±0,13		0,2827±0,0209	2,46±0,17	
3	65	0,0689±0,0008	10,06±0,11	24,60±	0,1008±0,0031	6,88±0,21	18,28±	0,1170±0,0052	5,93±0,27	27,75±
	80	0,1024±0,0099	6,82±0,70	1,09 ^c	0,1384±0,0074	5,02±0,27	3,55 ^b	0,2145±0,0045	3,23±0,07	1,17a,b
	95	0,1406±0,0035	4,93±0,12		0,1712±0,0131	4,06±0,30		0,2599±0,0050	2,67±0,05	
4	65	0,0739±0,0042	9,39±0,52	18,13±	0,0920±0,0041	7,55±0,33	15,63±	0,1040±0,0016	6,67±0,11	29,80±
	80	0,1040±0,0022	6,67±0,14	1,26 ^{c,f}	0,1181±0,0079	5,89±0,40	1,28 ^{b,c,d}	0,2041±0,0003	3,40±0,01	0,96 ^{c,e}
	95	0,1247±0,0029	5,56±0,13		0,1447±0,0088	4,80±0,29		0,2450±0,0029	2,83±0,03	
5	65	0,0408±0,0003	16,99±0,14	16,80±	0,0599±0,0001	11,57±0,02	10,09±	0,0727±0,0004	9,53±0,05	36,90±
	80	0,0560±0,0039	12,41±0,89	1,86 ^{d,f}	0,0684±0,0016	10,14±0,24	0,74 ^c	0,1787±0,0059	3,88±0,13	0,66 ^{d,f}
	95	0,0663±0,0031	10,46±0,50		0,0803±0,0019	8,64±0,20		0,2098±0,0044	3,30±0,07	
6	65	0,0538±0,0100	13,15±2,21	10,10±	0,0775±0,0026	8,95±0,30	10,80±	0,0877±0,0043	7,92±0,39	35,44±
	80	0,0664±0,0045	10,48±0,69	4,28 ^e	0,0958±0,0101	7,29±0,80	1,56 ^{c,d}	0,2031±0,0066	3,41±0,11	2,78 ^{e,f}
	95	0,0713±0,0041	9,74±0,54		0,1058±0,0026	6,55±0,16		0,2429±0,0165	2,86±0,19	

•valores de E_a com a mesma letra são estatisticamente iguais (* $p < 0.05$). A análise estatística foi efetuada separadamente para cada valor de pH

Como seria de esperar, através da análise dos resultados da Tabela 3.7 foi possível observar, para todos os valores de pH, o aumento da constante de degradação, k , e correspondente declínio dos tempos de semi-vida, há medida que a temperatura aumenta. Todos os derivados lipofílicos estudados apresentam tempos de semi-vida superiores, comparativamente com o seu precursor, assim como valores de k inferiores. Não parece existir uma relação linear entre o tamanho da cadeia carbonada dos derivados lipofílicos e os parâmetros de degradação, sendo que um dos pigmentos mais lipofílicos, Cy3glc-C10 **(13)** revelou ser o pigmento com maior estabilidade.

Por outro lado, os dados obtidos mostraram que o pH da solução influenciou a cinética da degradação da Cy3glc assim como dos seus derivados acilados. De um modo geral, a estabilidade dos pigmentos diminuiu com o aumento do pH, tal como seria de esperar. A pH 3 o catião flavílio é a única espécie presente na solução de todos os pigmentos, sendo que nos derivados acilados a sua degradação ocorre em muito menor escala, comparativamente à Cy3glc. Adicionalmente, a energia de ativação, E_a , que mede a cinética da degradação de um composto com a variação da temperatura, diminuí com o aumento da cadeia lipídica do ácido gordo, seguindo um comportamento linear.

O catião flavílio continua a ser a espécie predominante a valores de pH 5, sendo que as restantes espécies existem em quantidades negligenciáveis na solução aquosa de SDS. Nos derivados acilados a fração molar do catião flavílio é de cerca de 90 %, sendo a principal espécie responsável pela cor das soluções e maior termoestabilidade, enquanto que na solução de Cy3glc, que continha 70 % de catião flavílio, apresentou menor termoestabilidade do pigmento **(9)**.

A pH 7, o catião de flavílio já não se encontra presente, ocorrendo a formação de equilíbrios mais complexos devido à contribuição das frações molares das diferentes espécies. A chalcona-*trans* (Ct) é a espécie predominante na solução de Cy3glc e a base quinoidal, A, a predominante nos derivados acilados, contendo aproximadamente 50 % desta fração molar. Para o pH 7, os valores de E_a dos pigmentos acilados foram superiores aos obtidos para a solução de Cy3glc ao mesmo pH, o que pode indicar que os derivados acilados possuem uma cinética de degradação mais rápida. No entanto, através dos valores de k e $t_{(1/2)}$ observamos que a acilação melhorou a termoestabilidade das antocianinas. Estes resultados sugerem que o mecanismo de degradação térmica a este pH pode não ser elementar, ocorrendo em vários passos devido à presença de múltiplas espécies.

De um modo geral, podemos concluir, através do estudo da degradação térmica e determinação dos seus parâmetros cinéticos, que a cadeia carbonada ligada ao açúcar da antocianina melhorou a estabilidade à cor da Cy3glc, sendo que este efeito foi mais

evidente quando elevadas percentagens do catião flavílio estão presentes e em equilíbrio (pH 3 e 5).

3.2.6. Constante de acidez aparente, pK'_a

De modo a confirmar a elevada estabilidade do pigmento lipofílico Cy3glc-C10 (**13**) em relação à Cy3glc, foram determinadas as suas constantes de acidez aparentes (pK'_a) através de experiências de saltos de pH (Figura 3.16).

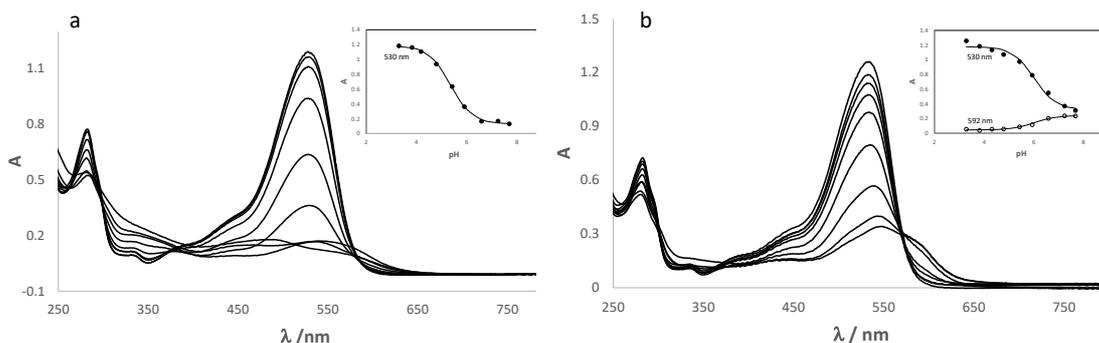


Figura 3.16. Variação do espectro de absorvância de soluções equilibradas de Cy3glc (a) e Cy3glc-C10 na presença de micelas SDS após saltos de pH. Inserido nos gráficos - fitting dos valores experimentais de absorvância em função do pH (a) $pK'_a=5,3$ e (b) $pK'_a=6,0$.

Através da determinação das constantes acídicas aparentes dos dois pigmentos, foi demonstrado que o derivado contendo a cadeia carbonada de 10 carbonos na solução micelar de SDS possui maior estabilização da sua cor, estendendo por 0,7 unidades o intervalo de pH em que a espécie vermelha, catião flavílio, e a base quinoidal azul são estáveis.

Para valores de pH 5-7 foi possível observar tons azuis-arroxeados da solução do derivado lipofílico, devido a provavelmente maior percentagem de base quinoidal enquanto que a solução de Cy3glc possuem maioritariamente a espécie chalcona-*trans*, resultando na perda da cor da solução inicial (Figura 3.17).

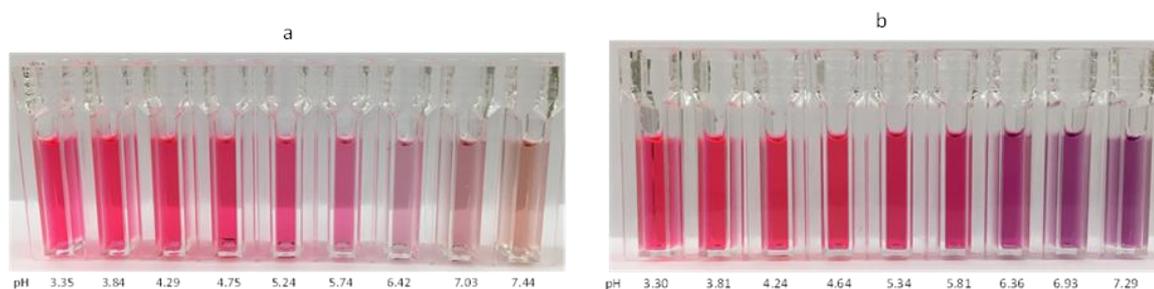


Figura 3.17. Soluções aquosas de (a) Cy3glc 5×10^{-5} M e (b) Cy3glc-C10 5×10^{-5} M em SDS 0,1M entre pH 3 e 7.

3.3. Atividade antioxidante

Uma das propriedades biológicas que mais despertou o interesse, não só da comunidade científica, bem como da indústria, é a elevada atividade antioxidante que as antocianinas possuem. Diversos estudos reportam uma relação benéfica entre a acilação e o melhoramento do poder antioxidante dos polifenóis^{128, 129}. Deste modo, e tendo em conta as estruturas dos novos derivados acilados sintetizados, foram realizados ensaios de peroxidação lipídica, de modo a avaliar de que forma a acilação influenciou o poder antioxidante destas moléculas. A peroxidação lipídica dos derivados acilados de Mv3glc foi determinada por dois métodos diferentes, de forma a corroborar os resultados obtidos. Assim, a atividade antioxidante foi determinada através da descoloração por β -caroteno e da medição do consumo de oxigénio.

A extensão da peroxidação sofrida pelo substrato lipídico, ácido linoleico, foi medida na presença dos derivados lipofílicos e do seu respetivo precursor, por medição da absorvância do β -caroteno, sob o efeito da temperatura. Através dos resultados obtidos foi possível observar uma relação entre o poder antioxidante e o tamanho da cadeia carbonada ligada à antocianina. Foi possível observar um aumento do poder antioxidante, há medida que a cadeia carbonada esterificada à Mv3glc aumentou (Figura 3.18 a). Esta tendência foi visível até ao derivado acilado com o ácido octanóico, sendo que pigmentos acilados com cadeia carbonadas superiores exibiram um decréscimo deste efeito. Todos os derivados acilados de Mv3glc exibiram atividade antioxidante igual ou superior à Mv3glc, com a exceção do derivado Mv3glc-C16.

De modo a validar os resultados acima descritos, foi também monitorizada a peroxidação de vesículas representativas de membranas biológicas (lipossomas) na presença de um composto de referência, Trolox, e na presença dos compostos lipofílicos bem como do seu precursor, por medição de oxigénio. Através da análise dos resultados obtidos foi possível confirmar as conclusões acima obtidas (Figura 3.18 b). O aumento da hidrofobicidade das antocianinas enalteceu a sua atividade antioxidante, sendo este fenómeno visível até ao derivado Mv3glc-C8. Metabolitos com lipofilicidade superior exibiram uma diminuição drástica da sua atividade antioxidante. Em ambos os ensaios o derivado com maior atividade antioxidante foi o pigmento acilado Mv3glc-C8.

Este efeito de aumento do poder antioxidante com o aumento da hidrofobicidade até um ponto crítico de viragem é descrito na literatura com o efeito “cut-off”, tendo sido reportado para emulsões, membranas e células de cultura¹³⁰⁻¹³². Este fenómeno tem sido explicado pela mobilidade, difusão e partição destes metabolitos antioxidantes num sistema multifásico, como por exemplo as emulsões, sendo influenciado pela polaridade dos compostos e pelo seu tamanho. Alguns estudos sugerem que este efeito é sobretudo

causado pela baixa difusão de compostos com grandes cadeias hidrofóbicas, sendo estes desviados da interface, local onde ocorre a oxidação. Por outro lado, compostos muito lipofílicos podem deixar de atuar como antioxidantes devido à maior probabilidade se encontrarem nos centros lipofílicos das emulsões, podendo até se encontrar em micelas. Adicionalmente, existe ainda a hipótese de estes compostos serem capazes de formar complexos entre si por auto-associação, sendo removidos da interface onde ocorre a oxidação^{120, 133}.

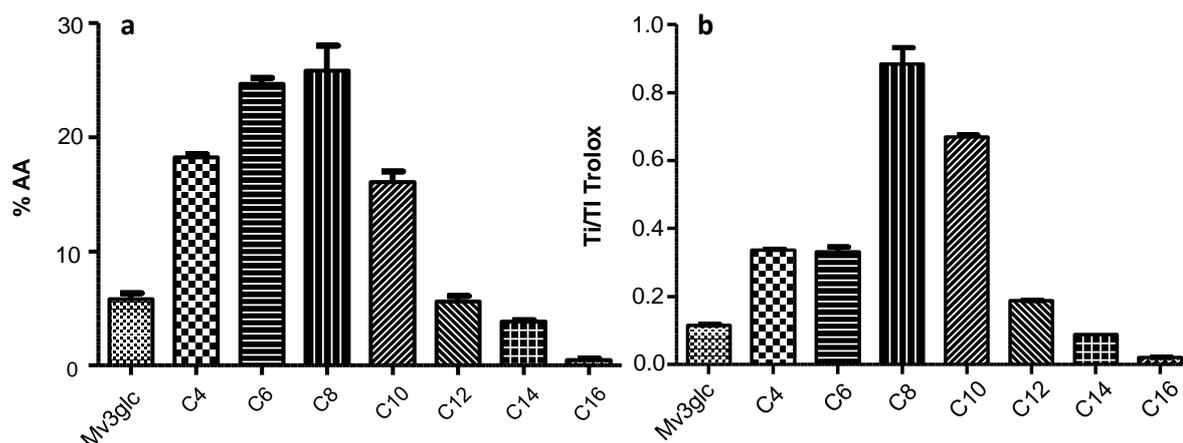


Figura 3.18. Atividade antioxidante dos derivados lipofílicos de Mv3glc, bem como do seu precursor, determinado por (a) descoloração de β -caroteno e por (b) consumo de oxigénio.

3.4. Reator de membranas

3.4.1. Seleção de membranas para suporte enzimático

Atualmente, a indústria tem preferência por processo contínuos, onde a síntese contínua está descrita como sendo capaz de formar produtos com rendimentos mais elevados com menor quantidade de catalisador. Deste modo, um método alternativo à atual síntese dos derivados de Cy3glc e Mv3glc foi estudado, nomeadamente, a síntese num reator de membrana.

Este método possibilita a interação dos reagentes com a enzima, previamente imobilizada na membrana, a um fluxo constante. Assim, e tendo em consideração as condições da acilação enzimática, foram selecionados quatro tipos de membranas (Tabela 3.8) compostas por diferentes materiais e porosidades diferentes. Os requisitos de seleção da membrana basearam-se no tipo de material da membrana, a sua porosidade e a resistência ao solvente orgânico. A imobilização da enzima CalB é promissora em suportes que possuam interfaces hidrofóbicas, como o propileno, devido à sua capacidade de atuar na interface de emulsões. Materiais como prolipropileno, PP, ou polietileno, PE, estão descritos como adequados para a imobilização de enzimas. Não foram selecionadas

membranas com porosidade superior a 10 kDa, de modo a garantir que não ocorrem grandes perdas de proteína durante a imobilização da enzima, descrita como tendo o peso de 30-35 kDa.

Tabela 3.8. Descrição de membranas assimétricas de ultrafiltração utilizadas na imobilização de CalB

Membrana	Material			Porosidade (kDa)
	Fornecedor	Camada de suporte	Camada superior	
P10	Pall	Celulose		10
P5	Pall	Celulose		5
N5	NADIR	Poliéter/polipropileno (PE/PP)	Poliétersulfona (PES)	5
N1	NADIR	Poliéter/polipropileno (PE/PP)		1

As membranas selecionadas foram submetidas a testes de resistência ao solvente utilizado na reação, 2-Me-2-Bu, assim como outros solventes descritos na esterificação enzimática, onde 1 cm x 1 cm de membrana foi submergido em diferentes solventes (Tabela 3.9). A degradação da membrana pode ocorrer através da alteração da cor inicial das membranas, cor branca, da alteração da espessura e, em casos de degradação muito rápida, ocorre a dissolução da membrana. Foi verificado que nenhuma membrana sofreu qualquer alteração após dois dias emersa em 2-Me-2-Bu, sendo este solvente compatível com as membranas selecionadas. Após um dia de emersão em acetonitrilo as membranas sofreram alteração da sua cor, tornando-se amareladas, prova que foram degradadas. Após um dia de imersão em acetona observou-se o aumento da espessura e a alteração da cor da membrana. A acetona provocou a dissolução total das membranas após dois dias de emersão, não sendo este solvente compatível com qualquer das membranas escolhidas. Podemos, portanto, concluir que a acetona e, mais lentamente, o acetonitrilo provocaram a degradação das membranas, sendo que o solvente ótimo para a síntese no reator de membranas foi o 2-Me-2-Bu.

Tabela 3.9. Ensaio de estudos de resistência de membranas a solventes orgânicos.

Membranas	Solventes	Espessura	Cor	Solubilização
P10	2-Me-2-Bu	Não alterou	Não alterou	Não dissolveu
P10	Acetona	Inchou	Ficou amarela	Dissolveu
P10	Acetonitrilo	Não alterou	Ficou amarela	Não dissolveu
P5	2-Me-2-Bu	Não alterou	Não alterou	Não dissolveu
P5	Acetona	Inchou	Ficou amarela	Dissolveu
N5	Acetonitrilo	Não alterou	Ficou amarela	Não dissolveu
N1	2-Me-2-Bu	Não alterou	Não alterou	Não dissolveu
N1	Acetona	Inchou	Ficou amarela	Dissolveu
N1	Acetonitrilo	Não alterou	Ficou amarela	Não dissolveu

3.4.2. Perfil proteico da amostra por MALDI-TOF e SDS-PAGE

A amostra de material proteico utilizada, CalB liofilizada, proveniente do fungo *Aspergillus niger*, foi analisada por eletroforese SDS-PAGE e MALDI-TOF. Na análise do perfil proteico da amostra por eletroforese, SDS-PAGE, e espectrometria de massa, MALDI-TOF, foram detetadas algumas proteínas de elevado peso molecular, sendo que CalB é a principal proteína identificada, com o peso molecular de 35 kDa (Figura 3.19). Através da análise do espectro de massa é possível determinar que CalB se encontra com elevada pureza na amostra, sendo que os ensaios de imobilização que decorreram assumiu-se que a amostra se encontrava pura.

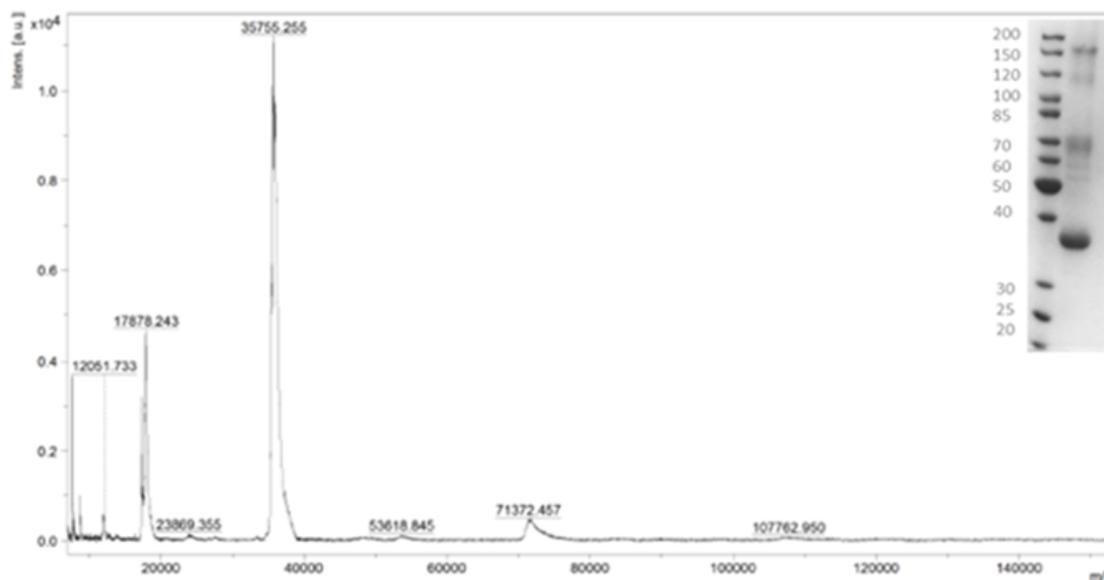


Figura 3.19. Análise de amostra proteica liofilizada por espectrometria de massa por MALDI-TOF e SDS-PAGE.

3.4.3. Estudo de variáveis de enzima e antocianina em bulk

Como já foi anteriormente referido, a imobilização da enzima afeta a estabilidade e atividade da enzima. Deste modo, o rácio ótimo entre antocianina e a amostra proteica foi estudado através de várias reações, utilizando CalB liofilizada, (Tabela 3.10). O estudo das condições ótimas foi realizado através da síntese do derivado acilado Cy3glc-C8, sendo que deteção de produto foi realizado através da análise por HPLC-DAD. Nas reações 1-4 foi estudada a variação de substrato (antocianina + ácido gordo) e a quantidade de CalB liofilizada foi a variável estudada nas reações 5-9. A monitorização da formação de produto foi efetuada através da análise por HPLC-DAD.

Tabela 3.10. Estudo das variáveis de enzima e antocianina em reações em bulk

Reações	Cy3glc (mg)	2-Me-2-Bu (mL)	C8 (µL)	Ca/B (mg)	MS4Å(mg)
1	2	4	66	240	400
2	5	4	149	240	400
3	7	4	229	240	400
4	10	4	297	240	400
5	7	4	149	32	400
6	7	4	149	64	400
7	7	4	149	80	400
8	7	4	149	120	400
9	7	4	149	200	400

Em todas as sínteses foi observado que a formação de produto foi atingida entre as 8 h e as 12 h de reação. No estudo da variação da concentração de Cy3glc foi observado que para concentrações superiores a 0,5 mg/mL (reação 2) os rendimentos foram superiores e semelhantes entre si. Com ensaios da variação de concentração de CalB liofilizada foi observado a formação máxima do éster Cy3glc-C8 quando se utilizou a concentração de 30 g/L (reação 8). Assim, as reações realizadas no reator de membranas foram efetuadas nas condições ótimas acima observadas com 1,75 mg/mL de Cy3glc, 100 eq. de ácido octanóico. 100 g/L de filtros moleculares, dissolvidos em 4 mL de 2-Me-2-Bu e 30 g/L de CalB liofilizada, após a sua imobilização na membrana.

3.4.4. Imobilização do catalisador enzimático

A imobilização da enzima foi efetuada em diferentes membranas, tendo sido estudado a influência da pressão exercida, assim como do material e porosidade da membrana. A porosidade da membrana é, como já foi referido, um dos requisitos na seleção da membrana mais importantes para retenção ótima da enzima. De facto, foi possível observar que, ao aplicar a mesma pressão em membranas compostas pelo mesmo material, a percentagem de enzima retida é superior na membrana P5 do que na membrana P10. Esta diferença ocorre devido ao facto de as membranas possuírem diferentes porosidades, sendo que a membrana P5 tem 5 kDa de porosidade enquanto que a P10 possui uma porosidade de 10 kDa (Tabela 3.11). A pressão aplicada foi também um fator importante na imobilização da enzima. A aplicação de pressões elevadas pode potenciar a libertação da enzima, forçando a alteração da estrutura da enzima de modo a esta ser eluída, podendo mesmo ocorrer a destruição da membrana. No entanto, pressões demasiado baixas não garantem a retenção eficiente da enzima no suporte, havendo o risco de ocorrer a libertação da enzima do suporte durante a síntese. Através dos ensaios realizados foi visível que a imobilização de CalB foi promovida pelo uso de baixas pressões, sendo que membranas P5 retiveram percentagens mais elevadas de CalB quando sofreram baixas pressões, contrariamente ao que se observou durante a imobilização da enzima a pressões superiores. Adicionalmente, foi observado que a retenção de enzima foi maior quando a camada de suporte da membrana é constituída por uma mistura de polímeros PE/PP, sendo que para membranas com a mesma porosidade (5 kDa) sob a mesma pressão (0,4 bar), a membrana P5 reteve mais enzima (73 %) do que a N5 (63 %). Após o estudo destas variáveis foi realizada uma última imobilização, de modo a maximizar a quantidade de CalB liofilizada retida, utilizando uma membrana assimétrica com porosidade de 1 kDa (N1).

Tabela 3.11. Capacidade de retenção da enzima CalB dependendo do tipo de membrana e pressão aplicada

Suporte	Pressão (bar)	Porosidade (kDa)	Imobilização de CalB (%)
Pall	0,4	5	73 ^a
Pall	0,4	10	70 ^a
Pall	0,028	10	77 ^a
NADIR	0,4	5	63 ^a
NADIR	0,028	1	95 ^b

^adeterminado por espectroscopia UV-Vis

^bdeterminado por HPLC-DAD

3.4.5. Ensaio de atividade enzimática - Síntese de Cy3glc-C8 num reator de membranas

Após o processo de imobilização, a atividade enzimática da enzima foi determinada através da síntese do derivado Cy3glc-C8. Assim, e tendo em conta que os resultados obtidos nos ensaios de imobilização, as acilações foram efetuadas com CalB previamente imobilizada em membranas com porosidade máxima (10 kDa), e através do método convencional, por aquecimento e agitação. As esterificações decorreram nas mesmas condições, de modo a estudar influência da imobilização na estabilidade da enzima. Após a imobilização, as membranas foram aplicadas numa célula contactor de Teflon. A mistura reacional sofreu temperaturas ligeiramente superiores (65 °C) às descritas como ótimas para a atividade enzimática de CalB, de modo a garantir que esta se encontrava a 60 °C quando entra em contacto com a enzima imobilizada (Figura 3.20).

A formação do pigmento lipofílico ocorreu mais cedo, sendo a sua formação detetada após 2 h de reação, comparativamente ao que se observa nas reações em bulk, onde a formação do produto é observada apenas após 6 h de reação. As reações no reator de membranas atingem o tempo ótimo de reação mais cedo, após 14 h, enquanto que a formação máxima de Cy3glc-C8 nas reações em bulk é atingida após 26 h de reação. Através destes resultados confirmamos que a imobilização provocou o aumento da estabilidade da enzima, influenciando diretamente o rendimento da síntese de Cy3glc-C8.

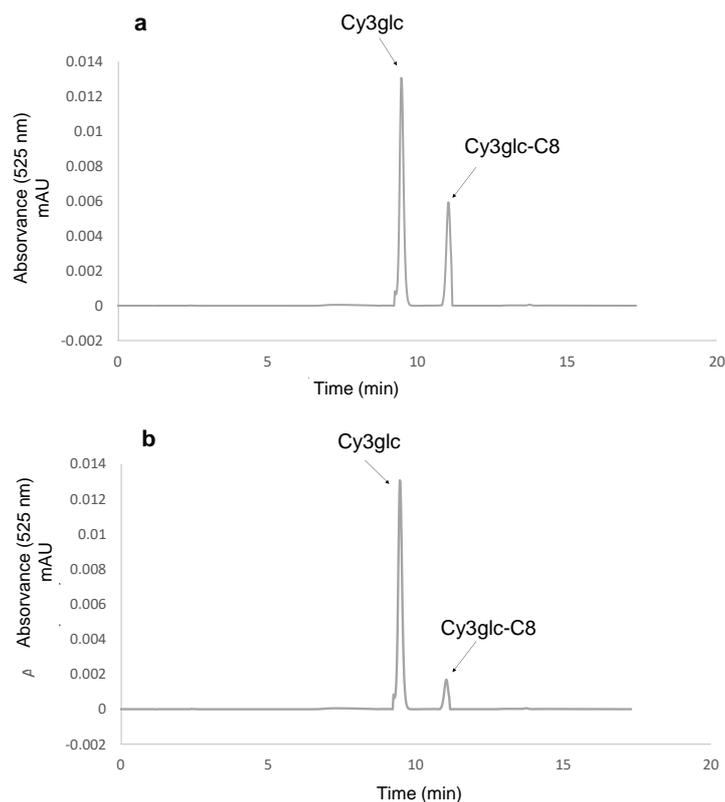


Figura 3.20. Cromatogramas de Cy3glc-C8 no tempo máximo de formação de produto, sendo (a) reação decorrida no reator de membranas, com enzima imobilizada em membranas com *cut-off* de 10 kDa e (b) reação decorrida com enzima não modificada.

Com o objetivo de estudar a capacidade de eficiência da imobilização da enzima, foram realizadas sínteses de Cy3glc-C8 em membranas com *cut-off* de 10 kDa, antes e após o processo de purificação. O processo de purificação baseia-se na lavagem da membrana, após o processo de imobilização, com tampão fosfato (0,1M, pH 6). Alíquotas do volume permeado foram analisadas por espectrometria UV-Vis, assim como por HPLC, tendo sido detetado a presença de material proteico. Após o processo de purificação restaram cerca de 0,055 mg de material proteico por mm² de membrana, procedendo à síntese de Cy3glc-C8 nas membranas A e B (Figura 3.21). Os rendimentos obtidos foram semelhantes para ambas as reações, sendo que a formação máxima de produto foi atingida, para todas as reações, ao final de 14 h. Através da monitorização da formação de produto podemos concluir que a quantidade de enzima presente nas membranas A e B foi sensivelmente a mesma, sendo que o material proteico visível detetado no permeado outras proteínas presentes na amostra.

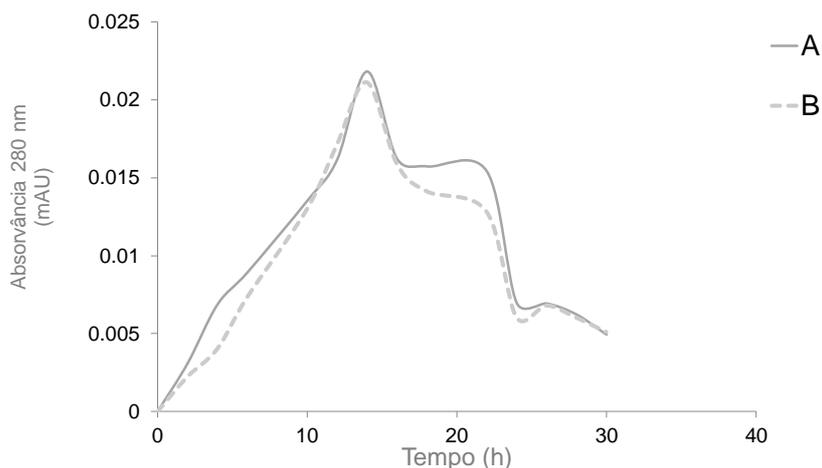


Figura 3.21. Formação do produto Cy3glc-C8, num reator de membranas utilizando como catalisador a amostra proteica imobilizada numa membrana com *cut-off* de 10 kDa, sendo (A) após imobilização da enzima e (B) após imobilização da enzima e lavagem da membrana.

De modo a testar a reutilização da enzima imobilizada foram realizados testes preliminares de sínteses contínuas. Os ensaios de síntese contínua de Cy3glc-C8 ocorreram em reatores de membranas com membranas de porosidade de 1 kDa, com enzima previamente imobilizada (Figura 3.22). Através da análise das reações enzimáticas ao longo do tempo, por HPLC-DAD, foi possível obter rendimentos semelhantes na formação de produto entre as três reações que ocorrem em sequência (A, B e C) que decorreram sequencialmente, sendo que a formação de produto foi detetada através da análise por HPLC-DAD. As reações comportaram-se de forma semelhante, tendo sido a formação de produto máxima foi atingida ao mesmo tempo (14 h), com rendimentos semelhantes. Assim, podemos concluir que é possível utilizar a membrana com enzima retida em processos de síntese contínuos durante pequenos períodos de tempo, sendo necessário estudar a sua atividade em períodos de mais longos.

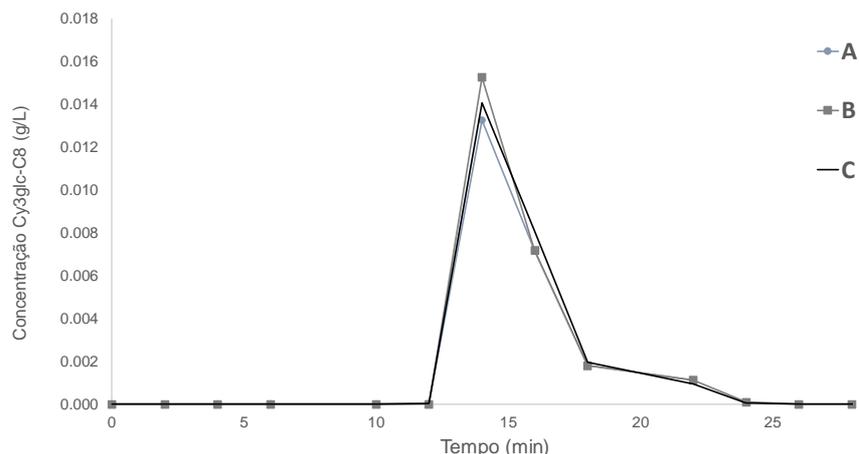


Figura 3.22. Concentração de Cy3glc-C8 durante a reação enzimática num reator de membranas, sendo (A) a reação que ocorreu na membrana, (B) a reação com membrana reutilizada e (C) a reação com enzima após duas utilizações da membrana.

Finalmente, sínteses de Cy3glc-C8 foram realizadas num reator de membranas com membranas de porosidade diferentes (10 kDa e 1 kDa) (Figura 3.23). A reação utilizando membranas com *cut-off* de 1 kDa (N1) obteve rendimentos muito inferiores aos obtidos na síntese com a membranas com *cut-off* de 10 kDa (P10). Contrariamente ao que seria de esperar, não foi observado a maior formação de produto nas sínteses utilizando N1 com enzima retida, comparativamente às reações com enzima retida em P10, apesar de N1 possuir menor porosidade, levando à maior quantidade de material proteico retido na membrana, comparativamente à síntese com enzima retida em membranas P10. Podemos assumir que a membrana com 1 kDa reteve a enzima CalB assim como impurezas contidas na amostra, que não foram detetadas na análise do perfil proteico da amostra. Estas impurezas, na imobilização de enzima na membrana com 10 kDa de porosidade terão sido eluídas, devido à grande porosidade da membrana. Podemos ainda assumir que estas impurezas, de peso molecular menor ao da enzima, estarão, de algum modo a inibir a reação (por mecanismos de competição, ou dificultar o acesso dos reagentes ao centro da enzima). No entanto, será necessário realizar mais estudos de interação enzima/membrana de modo a estudar a influência das impurezas na atividade enzimática.

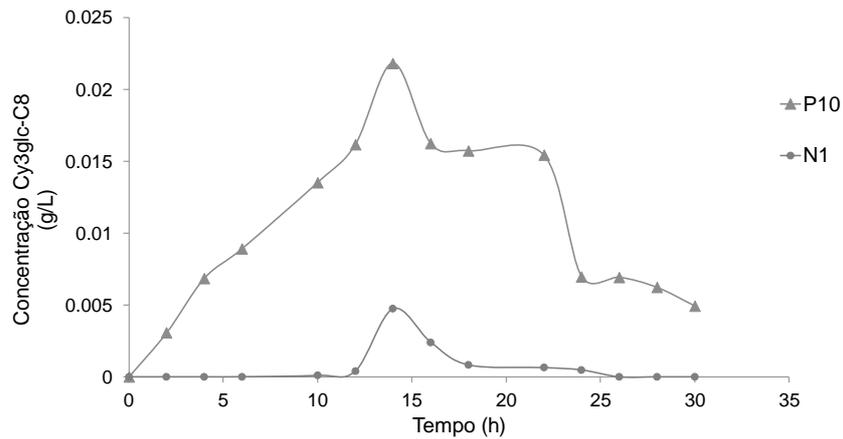


Figura 3.23. Concentração de Cy3glc-C8 durante a reação enzimática num reator de membranas com enzima imobilizada, sendo **(P10)** a reação que ocorreu na membrana com 10 kDa de porosidade e **(N1)** a reação que ocorreu na membrana com 1 kDa de porosidade com membrana reutilizada e **(C)** a reação com enzima após duas utilizações da membrana.

A síntese no reator de membranas encontra-se nos estados iniciais de desenvolvimento, sendo necessário, no futuro, otimizar os métodos de análise da enzima de modo a caracterizar das proteínas presentes na amostra. O estudo da influência das impurezas deve ser determinado, sendo no futuro realizadas mais experiências após o isolamento da enzima.

IV. Conclusões

Conclusões e perspectivas futuras

Globalmente, o estudo de reações de acilação de antocianinas usando biocatalisadores foi realizado com sucesso, tendo permitido a síntese de novos compostos.

Através da caracterização estrutural por RMN e por espectrometria de massa dos pigmentos sintetizados foi comprovado que a acilação é dada apenas no álcool primário do açúcar e não no catião flavílio.

A lipofilicidade dos derivados foi afetada pelo tamanho da cadeia lipídica ligado à antocianina. A polaridade dos derivados aumenta com o aumento da cadeia carbonada dos derivados sintetizados, obtendo assim um grupo de derivados antociânicos mais lipofílicos que a antocianina. Os derivados lipofílicos sintetizados revelam possuir maior solubilidade em matrizes lipídicas, comparativamente às antocianinas monoglucósidas, pelo que a sua aplicação tecnológica como corante não se encontra limitada a apenas soluções hidrofílicas.

As propriedades cromáticas dos pigmentos lipofílicos sintetizados foram também afetadas com a adição do ácido gordo. O desvio batocromático do espectro de absorção aumentou com o aumento da cadeia lipídica do derivado acilado, provocando a alteração da cor dos pigmentos sintetizados, sendo que os derivados lipofílicos com 10 ou mais carbonos apresentam tonalidades azuis-violeta a pH 7.

Com o estudo da estabilidade da cor confirmou-se que a modificação estrutural efetuada na Cy3glc aumentou a lipofilicidade assim como a sua termoestabilidade. A estabilidade da cor foi estudada em três diferentes pH's; a pH 3, característico dos vinhos e sumos de frutas ácidas, a pH 5, característico dos iogurtes e cremes de tratamento de pele e a pH 7, o valor de pH neutro em que se encontram na maioria dos cremes de hidratação. A acilação da antocianina com ácidos gordos insaturados melhorou a estabilidade da cor da antocianina num meio lipofílico (sistema SDS). Os parâmetros cinéticos da degradação térmica demonstraram que os derivados lipofílicos são menos suscetíveis à degradação pela temperatura, comparativamente ao seu precursor. As constantes aparentes de equilíbrio, pK'_a , determinadas para o pigmento Cy3glc-C10, demonstraram a estabilização superior das suas espécies coradas (catião flavílio e base quinoidal), para intervalos de pH mais largos do que a Cy3glc. Estes resultados indicaram que os derivados lipofílicos são mais estáveis em matrizes lipofílicas a diferentes valores de pH, permitindo a sua potencial aplicação como corante em matrizes lipídicas, como por exemplo em produtos cosméticos ou matrizes alimentares.

Estudos de atividade antioxidante demonstraram que a esterificação com uma cadeia até oito carbonos aumentou o poder antioxidante das antocianinas. Todos os

derivados lipofílicos de Mv3glc, com a exceção de Mv3glc-C14 e Mv3glc-C16, demonstraram atividade antioxidante igual ou superior à da Mv3glc.

O desenvolvimento de um método alternativo de lipofilização de antocianinas foi obtido com sucesso, encontrando-se ainda numa fase inicial. Através da imobilização da enzima foi possível proceder à síntese do derivado lipofílico num reator de membranas, tendo sido detetado a formação de produto. Os estudos preliminares indicaram que a enzima imobilizada na membrana possuía maior atividade, comparativamente à mesma amostra liofilizada, produzindo o derivado Cy3glc-C8 mais rapidamente e com melhor rendimento. A reutilização da membrana com enzima retida foi estudada durante curtos períodos de tempo, através da síntese contínua de Cy3glc-C8. Não foram observadas alterações na formação de Cy3glc-C8, com as reações a obter rendimentos semelhantes, comprovando que a enzima retida na membrana não é facilmente removida.

No futuro, pretende-se obter diferentes derivados de antocianinas aos já sintetizados, de modo a obter uma extensa biblioteca de compostos com diferentes características físico-químicas. Será também necessário efetuar ensaios de estabilidade química com diferentes surfactantes mais biocompatíveis (glicolípidos), tendo como objetivo o estudo da incorporação dos pigmentos acilados. A bioatividade dos compostos será determinada, nomeadamente a avaliação da citotoxicidade nas células da epiderme e do sistema digestivo, e da absorção de raios UV, ponto-chave na luta contra o envelhecimento precoce da pele. A síntese no reator de membranas será também otimizada, sendo realizados ensaios de imobilização e posterior síntese com a amostra de enzima purificada, de modo a estudar a influencia das impurezas na reação enzimática.

Finalmente, serão estudadas novas potenciais aplicações dos derivados lipofílicos, nomeadamente como um indicador qualitativo do prazo de validade de produtos alimentares (sensores de pH).

Referências bibliográficas

1. Francis, F. J., Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference* **1995**, *6*, 149-155.
2. Amchova, P.; Kotolova, H.; Ruda-Kucerova, J., Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2015**, *73*, 914-922.
3. Yao, Y.; Wang, W.; Tian, K.; Ingram, W. M.; Cheng, J.; Qu, L.; Li, H.; Han, C., Highly reproducible and sensitive silver nanorod array for the rapid detection of Allura Red in candy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, *195*, 165-171.
4. Yang, X. H.; Luo, E.; Liu, X.; Han, B.; Yu, X. P.; Peng, X. L., Delphinidin-3-glucoside suppresses breast carcinogenesis by inactivating the Akt/HOTAIR signaling pathway. *Bmc Cancer* **2016**, *16*.
5. Xu, Y.; Hu, D.; Bao, T.; Xie, J.; Chen, W., A simple and rapid method for the preparation of pure delphinidin-3-O-sambubioside from Roselle and its antioxidant and hypoglycemic activity. *Journal of Functional Foods* **2017**, *39*, 9-17.
6. Chalker-Scott, L., Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, *70*, 1-9.
7. Bennett, R. N.; Wallsgrove, R. M., Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* **1994**, *127*, 617-633.
8. Kant, M. R.; Jonckheere, W.; Knecht, B.; Lemos, F.; Liu, J.; Schimmel, B. C. J.; Villarreal, C. A.; Ataíde, L. M. S.; Dermauw, W.; Glas, J. J.; Egas, M.; Janssen, A.; Van Leeuwen, T.; Schuurink, R. C.; Sabelis, M. W.; Alba, J. M., Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Annals of Botany* **2015**, *115*, 1015-1051.
9. Chen, Y. P.; Meng, J. X.; Zhu, Z. P.; Zhang, F. L.; Wang, L. Y.; Gu, Z.; Wang, S. T., Bio-Inspired Underwater Super Oil-Repellent Coatings for Anti-Oil Pollution. *Langmuir* **2018**, *34*, 6063-6069.
10. Zhang, Y.; Butelli, E.; Martin, C., Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2014**, *19*, 81-90.
11. Clifford, M. N., Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, *80*, 1063-1072.
12. Chen, S. S.; Zeng, Z.; Hu, N.; Bai, B.; Wang, H. L.; Suo, Y. R., Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chemistry* **2018**, *242*, 1-8.
13. Godos, J.; Marventano, S.; Mistretta, A.; Galvano, F.; Grosso, G., Dietary sources of polyphenols in the Mediterranean healthy Eating, Aging and Lifestyle (MEAL) study cohort. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **2017**, *68*, 750-756.
14. Chastain, S. E.; Moss, M., Green and Black Tea Polyphenols Mechanistically Inhibit the Aggregation of Amyloid-beta in Alzheimer's Disease. *Biophysical Journal* **2015**, *108*, 357A-357A.
15. Chun, H. S.; Kim, J. M.; Choi, E. H.; Chang, N., Neuroprotective effects of several Korean medicinal plants traditionally used for stroke remedy. *Journal of Medicinal Food* **2008**, *11*, 246-251.
16. Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvado, J.; Covas, M. I.; Corella, D.; Aros, F.; Gomez-Gracia, E.; Ruiz-Gutierrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R. M.; Serra-Majem, L.; Pinto, X.; Basora, J.; Munoz, M. A.; Sorli, J. V.; Martinez, J. A.; Martinez-Gonzalez, M. A.; Investigators, P. S., Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine* **2013**, *368*, 1279-1290.
17. George, V. C.; Dellaire, G.; Rupasinghe, H. P. V., Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2017**, *45*, 1-14.

18. Renaud, S.; Delorgeril, M., Wine, alcohol, platelets, and the French Paradox for coronary heart-disease. *Lancet* **1992**, 339, 1523-1526.
19. Catalgol, B.; Batirel, S.; Taga, Y.; Ozer, N., Resveratrol: French Paradox Revisited. *Frontiers in Pharmacology* **2012**, 3.
20. Wang, T.; Jonsdottir, R.; Olafsdottir, G., Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* **2009**, 116, 240-248.
21. Zhang, H.; Tsao, R., Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* **2016**, 8, 33-42.
22. Fernandes, I.; Marques, F.; de Freitas, V.; Mateus, N., Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. *Food Chemistry* **2013**, 141, 2923-2933.
23. Mayén, M.; Mérida, J.; Medina, M., Flavonoid and Non-Flavonoid Compounds During Fermentation and Post-Fermentation Standing of Musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, 255.
24. Qsaib, S.; Mateus, N.; Ikbarl, F. E. Z.; Rifai, L. A.; de Freitas, V.; Koussa, T., Direct Identification and Characterization of Phenolic Compounds from Crude Extracts of Buds and Internodes of Grapevine (*Vitis vinifera* cv Merlot). *Natural Product Communications* **2014**, 9, 1569-1572.
25. Peixoto, C. M.; Dias, M. I.; Alves, M. J.; Calhella, R. C.; Barros, L.; Pinho, S. P.; Ferreira, I., Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry* **2018**, 253, 132-138.
26. Baron, M.; Sochor, J.; Tomaskova, L.; Prusova, B.; Kumsta, M., Study on Antioxidant Components in Rose Wine Originating from the Wine Growing Region of Moravia, Czech Republic. *Erwerbs-Obstbau* **2017**, 59, 253-262.
27. Minnaar, P.; Nyobo, L.; Jolly, N.; Ntushelo, N.; Meiring, S., Anthocyanins and polyphenols in Cabernet Franc wines produced with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* yeast strains: Spectrophotometric analysis and effect on selected sensory attributes. *Food Chemistry* **2018**, 268, 287-291.
28. He, M.; Tian, H. L.; Luo, X. W.; Qi, X. H.; Chen, X. H., Molecular Progress in Research on Fruit Astringency. *Molecules* **2015**, 20, 1434-1451.
29. German, J. B.; Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Hansen, R. J.; Walzem, R. L., Wine Phenolics and Targets of Chronic Disease. In *Wine*, American Chemical Society: 1997; Vol. 661, pp 196-214.
30. Peixoto, C. M.; Dias, M. I.; Alves, M. J.; Calhella, R. C.; Barros, L.; Pinho, S. P.; Ferreira, I. C. F. R., Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry* **2018**, 253, 132-138.
31. George, V. C.; Vijesh, V. V.; Amaraathna, D. I. M.; Lakshmi, C. A.; Anbarasu, K.; Kumar, D. R. N.; Ethiraj, K. R.; Kumar, R. A.; Rupasinghe, H. P. V., Mechanism of Action of Flavonoids in Prevention of Inflammation-Associated Skin Cancer. *Current Medicinal Chemistry* **2016**, 23, 3697-3716.
32. Zakaria, N. N. A.; Okello, E. J.; Howes, M. J.; Birch-Machin, M. A.; Bowman, A., In vitro protective effects of an aqueous extract of *Clitoria ternatea* L. flower against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and UV-induced mtDNA damage in human keratinocytes. *Phytotherapy Research* **2018**, 32, 1064-1072.
33. Kostyuk, V.; Potapovich, A.; Albuhaydar, A. R.; Mayer, W.; De Luca, C.; Korkina, L., Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation Research* **2018**, 21, 91-101.
34. Wozniak, D.; Slusarczyk, S.; Domaradzki, K.; Drys, A.; Matkowski, A., Comparison of Polyphenol Profile and Antimutagenic and Antioxidant Activities in Two Species Used as Source of Solidaginis herba - Goldenrod. *Chemistry & Biodiversity* **2018**, 15.
35. Panico, A. M.; Cardile, V.; Avondo, S.; Garufi, F.; Gentile, B.; Puglia, C.; Bonina, F.; Santagati, N. A.; Ronsisvalle, G., The in vitro effect of a lyophilized extract of wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes. *Phytomedicine* **2006**, 13, 522-526.

36. Valentova, K.; Sima, P.; Rybkova, Z.; Krizan, J.; Malachova, K.; Kren, V., (Anti)mutagenic and immunomodulatory properties of quercetin glycosides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2016**, *96*, 1492-1499.
37. Sharma, A.; Kashyap, D.; Sak, K.; Tuli, H. S.; Sharma, A. K., Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. *Pharmaceutical Patent Analyst* **2018**, *7*, 15-32.
38. Survey, N. S.; Upadhyaya, C. P.; Kumar, B.; Young, K. E.; Yoon, D. Y.; Park, S. W., New Genera of Flavonols and Flavonol Derivatives As Therapeutic Molecules. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **2011**, *54*, 1-18.
39. Xiao, J. B., Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, *57*, 1874-1905.
40. Cruz, L. Estudo de Reações entre Catequinas e Antocianinas - Síntese de Novos Compostos. Universidade do Porto, Porto, 2010.
41. Timberlake, C. F., Anthocyanins—Occurrence, extraction and chemistry. *Food Chemistry* **1980**, *5*, 69-80.
42. Martinez-Gil, A. M.; Gutierrez-Gamboa, G.; Garde-Cerdan, T.; Perez-Alvarez, E. P.; Moreno-Simunovic, Y., Characterization of phenolic composition in Carignan noir grapes (*Vitis vinifera* L.) from six wine-growing sites in Maule Valley, Chile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2018**, *98*, 274-282.
43. Masci, A.; Coccia, A.; Lendaro, E.; Mosca, L.; Paolicelli, P.; Cesa, S., Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry* **2016**, *202*, 59-69.
44. Chen, S.; Zeng, Z.; Hu, N.; Bai, B.; Wang, H.; Suo, Y., Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chemistry* **2018**, *242*, 1-8.
45. Horbowicz, M.; Kosson, R.; Grzesiuk, A.; Dębski, H., Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. In *Vegetable Crops Research Bulletin*, 2008; Vol. 68, p 5.
46. Iwashina, T., Contribution to Flower Colors of Flavonoids Including Anthocyanins: A Review. *Natural Product Communications* **2015**, *10*, 529-544.
47. Grajeda-Iglesias, C.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Barouh, N.; Barea, B.; Fernandes, A.; de Freitas, V.; Salas, E., Isolation and Characterization of Anthocyanins from Hibiscus sabdariffa Flowers. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1709-1718.
48. Maskato, Y.; Talal, S.; Keasar, T.; Gefen, E., Red foliage color reliably indicates low host quality and increased metabolic load for development of an herbivorous insect. *Arthropod-Plant Interactions* **2014**, *8*, 285-292.
49. Ju, Z. G.; Liu, C. L.; Yuan, Y. B.; Wang, Y. Z.; Liu, G. S., Coloration potential, anthocyanin accumulation, and enzyme activity in fruit of commercial apple cultivars and their F1 progeny. *Scientia Horticulturae* **1999**, *79*, 39-50.
50. Borghesi, E.; Ferrante, A.; Gordillo, B.; Rodriguez-Pulido, F. J.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Mensuali-Sodi, A.; Malorgio, F.; Heredia, F. J., Comparative physiology during ripening in tomato rich-anthocyanins fruits. *Plant Growth Regulation* **2016**, *80*, 207-214.
51. Jaakola, L., New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science* **2013**, *18*, 477-483.
52. Sibley, J. L.; Ruter, J. M.; Eakes, D. J., Bark anthocyanin levels differ with location in cultivars of red maple. *Hortscience* **1999**, *34*, 137-139.
53. Vian, M. A.; Tomao, V.; Coulomb, P. O.; Lacombe, J. M.; Dangles, O., Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 5230-5235.
54. Hornedo-Ortega, R.; Alvarez-Fernandez, M. A.; Cerezo, A. B.; Garcia-Garcia, I.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C., Influence of Fermentation Process on the

Anthocyanin Composition of Wine and Vinegar Elaborated from Strawberry. *Journal of Food Science* **2017**, *82*, 364-372.

55. Shibata, K.; Shibata, Y.; Kasiwagi, I., Studies on anthocyanins color variation in anthocyanins. *Journal of the American Chemical Society* **1919**, *41*, 208-220.

56. Li, S. Y.; Liu, P. T.; Pan, Q. H.; Shi, Y.; Duan, C. Q., Association Between Modification of Phenolic Profiling and Development of Wine Color during Alcohol Fermentation. *Journal of Food Science* **2015**, *80*, C703-C710.

57. Qian, B. J.; Liu, J. H.; Zhao, S. J.; Cai, J. X.; Jing, P., The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. *Food Chemistry* **2017**, *228*, 526-532.

58. Zhao, C. L.; Chen, Z. J.; Bai, X. S.; Ding, C.; Long, T. J.; Wei, F. G.; Miao, K. R., Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular Diversity* **2014**, *18*, 687-700.

59. Cortez, R.; Luna-Vital, D. A.; Margulis, D.; de Mejia, E. G., Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2017**, *16*, 180-198.

60. Zhao, C. L.; Yu, Y. Q.; Chen, Z. J.; Wen, G. S.; Wei, F. G.; Zheng, Q.; Wang, C. D.; Xiao, X. L., Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry* **2017**, *214*, 119-128.

61. Francis, F. J.; Markakis, P. C., Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1989**, *28*, 273-314.

62. Garzon, G. A.; Wrolstad, R. E., The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chemistry* **2001**, *75*, 185-196.

63. Mori, K.; Goto-Yamamoto, N.; Kitayama, M.; Hashizume, K., Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany* **2007**, *58*, 1935-1945.

64. Patras, A.; Brunton, N. P.; O'Donnell, C.; Tiwari, B. K., Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology* **2010**, *21*, 3-11.

65. Oancea, S.; Draghici, O., pH and Thermal Stability of Anthocyanin-based Optimised Extracts of Romanian Red Onion Cultivars. *Czech Journal of Food Sciences* **2013**, *31*, 283-291.

66. Houbiers, C.; Lima, J. C.; Macanita, A. L.; Santos, H., Color stabilization of malvidin 3-glucoside: Self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 3578-3585.

67. Silva, V. O.; Freitas, A. A.; Macanita, A. L.; Quina, F. H., Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2016**, *29*, 594-599.

68. Santos, H.; Turner, D. L.; Lima, J. C.; Figueiredo, P.; Pina, F. S.; Maçanita, A. n. L., Elucidation of the multiple equilibria of malvin in aqueous solution by One- and two-dimensional NMR. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1227-1232.

69. Lima, J. C.; Vautier-Giongo, C.; Lopes, A.; Melo, E.; Quina, F. H.; Macanita, A. L., Color stabilization of anthocyanins: Effect of SDS micelles on the acid-base and hydration kinetics of malvidin 3-glucoside (Oenin). *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5851-5859.

70. Brouillard, R.; Delaporte, B.; Dubois, J. E., Chemistry of anthocyanin pigments .3. Relaxation amplitudes in pH-jump experiments. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 6202-6205.

71. Brouillard, R.; Lang, J., The Hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of Malvidin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1990**, *68*, 755-761.

72. Mendoza, J.; Pina, F.; Basilio, N.; Guimarães, M.; de Freitas, V.; Cruz, L., Extending the stability of red and blue colors of malvidin-3-glucoside-lipophilic derivatives in the presence of SDS micelles. *Dyes and Pigments* **2018**, *151*, 321-326.

73. Furtado, P.; Figueiredo, P.; Dasneves, H. C.; Pina, F., Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **1993**, *75*, 113-118.
74. Cabrita, L.; Petrov, V.; Pina, F., On the thermal degradation of anthocyanidins: cyanidin. *Rsc Advances* **2014**, *4*, 18939-18944.
75. Sinela, A.; Rawat, N.; Mertz, C.; Achir, N.; Fulcrand, H.; Dornier, M., Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry* **2017**, *214*, 234-241.
76. Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A., Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International* **2011**, *44*, 499-509.
77. Muller-Maatsch, J.; Bechtold, L.; Schweiggert, R. M.; Carle, R., Co-pigmentation of pelargonidin derivatives in strawberry and red radish model solutions by the addition of phenolic fractions from mango peels. *Food Chemistry* **2016**, *213*, 625-634.
78. Escribano-Bailon, M. T.; Santos-Buelga, C., Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16*, 715-723.
79. Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Ognier, S.; Engasser, J. M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M., Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *Journal of Biotechnology* **2004**, *110*, 265-271.
80. Zheng, M. M.; Wang, L.; Huang, F. H.; Guo, P. M.; Wei, F.; Deng, Q. C.; Zheng, C.; Wan, C. Y., Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2013**, *95*, 82-88.
81. Cruz, L.; Fernandes, V. C.; Araújo, P.; Mateus, N.; de Freitas, V., Synthesis, characterisation and antioxidant features of procyanidin B4 and malvidin-3-glucoside stearic acid derivatives. *Food Chemistry* **2015**, *174*, 480-486.
82. Fernando, W.; Coombs, M. R. P.; Hoskin, D. W.; Rupasinghe, H. P. V., Docosahexaenoic acid-acylated phloridzin, a novel polyphenol fatty acid ester derivative, is cytotoxic to breast cancer cells. *Carcinogenesis* **2016**, *37*, 1004-1013.
83. Rytel, E.; Tajner-Czopek, A.; Kita, A.; Kucharska, A. Z.; Sokol-Letowska, A.; Hamouz, K., Content of anthocyanins and glycoalkaloids in blue-fleshed potatoes and changes in the content of -solanine and -chaconine during manufacture of fried and dried products. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 719-727.
84. Fernandes, A.; Bras, N. F.; Mateus, N.; de Freitas, V., A study of anthocyanin self-association by NMR spectroscopy. *New Journal of Chemistry* **2015**, *39*, 2602-2611.
85. Yan, Z.; Li, C. Y.; Zheng, L. X.; Liu, Q.; Ou, S. Y.; Zeng, X. X., Enzymatic Acylation of Anthocyanin Isolated from Black Rice with Methyl Aromatic Acid Ester as Donor: Stability of the Acylated Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64*, 1137-1143.
86. de Araujo, M.; Franco, Y. E. M.; Messias, M. C. F.; Longato, G. B.; Pamphile, J. A.; Carvalho, P. D., Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits. *Planta Medica* **2017**, *83*, 7-22.
87. Hutchison, J. M.; Guest, J. S.; Zilles, J. L., Evaluating the Development of Biocatalytic Technology for the Targeted Removal of Perchlorate from Drinking Water. *Environmental Science & Technology* **2017**, *51*, 7178-7186.
88. Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S., Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances* **2015**, *33*, 1443-1454.
89. Arnold, F. H., Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angewandte Chemie-International Edition* **2018**, *57*, 4143-4148.
90. Klein-Marcuschamer, D.; Oleskowicz-Popiel, P.; Simmons, B. A.; Blanch, H. W., The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109*, 1083-1087.
91. Sumbly, K. M.; Grbin, P. R.; Jiranek, V., Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1-16.

92. Raynal, M.; Ballester, P.; Vidal-Ferran, A.; van Leeuwen, P., Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 1734-1787.
93. Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S., Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 2307-2413.
94. Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K., Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biological Procedures Online* **2016**, *18*.
95. Cruz, L.; Fernandes, I.; Guimaraes, M.; de Freitas, V.; Mateus, N., Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside-oleic acid conjugate. *Food & Function* **2016**, *7*, 2754-2762.
96. Wariishi, H.; Valli, K.; Gold, M. H., Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium*-Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 23688-23695.
97. Marty, A.; Chulalaksananukul, W.; Willemot, R. M.; Condoret, J. S., Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO₂. *Biotechnology and Bioengineering* **1992**, *39*, 273-280.
98. Razak, N. N. A.; Anuar, M. S. M., Enzymatic Synthesis of Flavonoid Ester: Elucidation of Its Kinetic Mechanism and Equilibrium Thermodynamic Behavior. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2015**, *54*, 5604-5612.
99. Viskupicova, J.; Danihelova, M.; Ondrejovic, M.; Liptaj, T.; Sturdik, E., Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. *Food Chemistry* **2010**, *123*, 45-50.
100. Viskupicova, J.; Ondrejovic, M.; Sturdik, E., The potential and practical applications of acylated flavonoids. *Pharmazie* **2009**, *64*, 355-360.
101. Vaisali, C.; Belur, P. D.; Iyyaswami, R., Lipase mediated synthesis of rutin fatty ester: Study of its process parameters and solvent polarity. *Food Chemistry* **2017**, *232*, 278-285.
102. Ma, X.; Yan, R. A.; Yu, S. Q.; Lu, Y. Y.; Li, Z.; Lu, H. H., Enzymatic Acylation of Isoorientin and Isovitexin from Bamboo-Leaf Extracts with Fatty Acids and Antiradical Activity of the Acylated Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 10844-10849.
103. de Araujo, M.; Franco, Y. E. M.; Alberto, T. G.; Messias, M. C. F.; Leme, C. W.; Sawaya, A.; Carvalho, P. D., Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by acylated derivatives of flavonoids synthesised enzymatically. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2017**, *32*, 978-985.
104. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A., Sequence, crystal-structure determination and refinement of 2 crystal forms of Lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994**, *2*, 293-308.
105. Stauch, B.; Fisher, S. J.; Cianci, M., Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *Journal of Lipid Research* **2015**, *56*, 2348-2358.
106. Gayot, S.; Santarelli, X.; Coulon, D., Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *Journal of Biotechnology* **2003**, *101*, 29-36.
107. Sheldon, R. A., Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349*, 1289-1307.
108. Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E., Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 453-468.
109. Dwevedi, A., Basics of Enzyme Immobilization. In *Enzyme Immobilization. Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*, Springer, Cham: 2016.
110. Cao, L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*. Wiley-VCH, Weinheim: 2005.
111. Cantone, S.; Ferrario, V.; Corici, L.; Ebert, C.; Fattor, D.; Spizzo, P.; Gardossi, L., Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 6262-6276.
112. Brady, D.; Jordaan, J., Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters* **2009**, *31*, 1639-1650.

113. Sheldon, R. A., Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Organic Process Research & Development* **2011**, *15*, 213-223.
114. Gebreyohannes, A. Y.; Dharmjeet, M.; Swusten, T.; Mertens, M.; Verspreet, J.; Verbiest, T.; Courtin, C. M.; Vankelecom, I. F. J., Simultaneous glucose production from cellulose and fouling reduction using a magnetic responsive membrane reactor with superparamagnetic nanoparticles carrying cellulolytic enzymes. *Bioresource Technology* **2018**, *263*, 532-540.
115. Sarasidis, V. C.; Plakas, K. V.; Patsios, S. I.; Karabelas, A. J., Investigation of diclofenac degradation in a continuous photo-catalytic membrane reactor. Influence of operating parameters. *Chemical Engineering Journal* **2014**, *239*, 299-311.
116. Meng, F. G.; Chae, S. R.; Drews, A.; Kraume, M.; Shin, H. S.; Yang, F. L., Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research* **2009**, *43*, 1489-1512.
117. Tran, D.-T.; Chang, J.-S.; Lee, D.-J., Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification processes. *Applied Energy* **2017**, *185*, 376-409.
118. Pyka, A.; Bober, K., Visualizing agents for short-chain fatty acids in TLC. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* **2005**, *18*, 141-146.
119. Cruz, L. F., I.; Guimaraes, M.; de Freitas, V.; Mateus, N., Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside-oleic acid conjugate. *Food Function* **2016**, *7*, 2754-2762.
120. Cruz, L.; Guimaraes, M.; Araujo, P.; Evora, A.; de Freitas, V.; Mateus, N., Malvidin 3-Glucoside-Fatty Acid Conjugates: From Hydrophilic toward Novel Lipophilic Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 6513-6518.
121. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, Molinspiration, Cheminformatics, Bratislava, Slovak Republic, Accessed in May 2018.
122. Kiraly-Veghely, Z.; Katay, G.; Tyihak, E.; Merillon, J. M., Separation of stilbene isomers from red wine by overpressured-layer chromatography. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* **2004**, *17*, 4-8.
123. Yang, W.; Kortessniemi, M.; Yang, B. R.; Zheng, J., Enzymatic Acylation of Anthocyanins Isolated from Alpine Bearberry (*Arctostaphylos alpina*) and Lipophilic Properties, Thermostability, and Antioxidant Capacity of the Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 2909-2916.
124. Salem, J. H.; Humeau, C.; Chevalot, I.; Harscoat-Schiavo, C.; Vanderesse, R.; Blanchard, F.; Fick, M., Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry* **2010**, *45*, 382-389.
125. Chen, L.; Xin, X.; Lan, R.; Yuan, Q.; Wang, X.; Li, Y., Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry* **2014**, *152*, 386-390.
126. Stevenson, D. E.; Wibisono, R.; Jensen, D. J.; Stanley, R. A.; Cooney, J. M., Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435 (R)). *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, *39*, 1236-1241.
127. Mulinacci, N.; Romani, A.; Pinelli, P.; Gallori, S.; Giaccherini, C.; Vincieri, F. F., Stabilisation of natural anthocyanins by micellar Systems. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *216*, 23-31.
128. Ishihara, K.; Nakajima, N., Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, *23*, 411-417.
129. Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kollis, F. N.; Stamatis, H., Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* **2005**, *116*, 295-304.
130. Oh, W. Y.; Shahidi, F., Antioxidant activity of resveratrol ester derivatives in food and biological model systems. *Food Chemistry* **2018**, *261*, 267-273.
131. Shahidi, F.; Zhong, Y., Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 3499-3504.

132. Leong, W. F.; Berton-Carabin, C. C.; Elias, R. J.; Lecomte, J.; Villeneuve, P.; Zhao, Y.; Coupland, J. N., Effect of lipophilization on the distribution and reactivity of ingredients in emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *459*, 36-43.
133. Laguerre, M.; Giraldo, L. J. L.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Barea, B.; Weiss, J.; Decker, E. A.; Villeneuve, P., Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of "Phenolipids" in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 2869-2876.