

Margaux Laura Matias

# **Modificações Estruturais de Compostos Polifenólicos Glicosilados e Modulação das suas Actividades Antioxidantes**

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e pela Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador pela oportunidade de realização deste trabalho, pela disponibilidade e sugestões feitas.

À Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva expresso a minha gratidão pela disponibilidade, atenção, paciência e empenho que demonstrou ao longo deste trabalho. Ainda, agradeço os seus conselhos e a revisão crítica da tese.

À Dona Graça, funcionária do Laboratório de Química Farmacêutica, pelo apoio, pela disponibilidade e simpatia que demonstrou no decorrer deste trabalho.

À minha família, pelo apoio incomensurável demonstrado.

Finalmente, gostaria de agradecer todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.



# Abreviaturas

<b>ASMC</b>	células de músculo liso arterial
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>AVC</b>	acidente vascular cerebral
<b>BHE</b>	barreira hematoencefálica
<b>BHT</b>	2,6-di-terc-butil-4-metil fenol
<b>bs</b>	do inglês “broad signal”
<b>CAL-B</b>	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
<b>CCF</b>	cromatografia em camada fina
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	clorofórmio deuterado
<b>CoA ou CoASH</b>	coenzima A
<b>d</b>	duplete
<b>dd</b>	duplo dublete
<b>ddq</b>	duplo duplo quarteto
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	dimetilsulfóxido <i>per</i> -deuterado
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
<b>dq</b>	duplo quarteto
<b>EC</b>	do inglês “ <i>Enzyme Commission</i> ”
<b>ee</b>	excesso enantiomérico
<b>HIV</b>	vírus da imunodeficiência humana
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta pressão
<b>IL-17</b>	interleucina-17
<b>IV</b>	infravermelho
<b>J</b>	constante de acoplamento
<b>LDL</b>	lipoproteínas de baixa densidade
<b>Log P</b>	logaritmo do coeficiente de partição
<b>m</b>	multipleto
<b>pf</b>	ponto de fusão
<b>pMCAO</b>	oclusão permanente da artéria cerebral média
<b>ppm</b>	partes por milhão
<b>PS</b>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<b>q</b>	quarteto
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	ressonância magnética nuclear de próton 1
<b>ROS</b>	espécies reactivas de oxigénio
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>s</b>	singuleto
<b>STS</b>	sintetase dos estilbenos
<b>t</b>	tripleto
<b>td</b>	triplo dublete
<b>UV</b>	ultravioleta



# Resumo

Os compostos polifenólicos glicosilados são largamente distribuídos na Natureza, sendo compostos biologicamente activos e, ainda, apresentam outras propriedades interessantes. Em particular, os estilbenos glicosilados, como a polidatina (substrato objecto de estudo neste presente trabalho), exercem inúmeras actividades biológicas, sendo utilizados em preparações alimentares, farmacêuticas e cosméticas.

A modificação de um dos grupos funcionais, em específico, destes compostos polifenólicos glicosilados por métodos químicos revela ser uma tarefa complexa, por isso, neste trabalho, métodos enzimáticos foram empregues. Efectivamente, estes últimos fornecem um processo eficaz para obter derivados mono- e diacilados com bons rendimentos.

Além disso, a crescente procura de processos químicos mais aceitáveis de um ponto de visto ambiental e económico tornou a biocatálise uma ferramenta tecnológica atractiva. Assim, a catálise biológica é muitas vezes referida como um “pilar” da Química Verde.

Adicionalmente, a catálise enzimática apresenta inúmeras vantagens que superam, muitas vezes, as suas desvantagens. Daí a sua utilização cada vez mais relevante em diversas áreas, nomeadamente na Indústria Farmacêutica.

Este trabalho tem como objectivo geral estudar modificações estruturais de um estilbeno glicosilado, através da biocatálise, de modo a melhorar as suas propriedades biológicas e farmacológicas.

Verificou-se que as duas lipases testadas, a lipase B de *Candida antarctica* e a lipase de *Pseudomonas cepacia*, aceitam a polidatina como substrato.

Deste modo, a acilação enzimática regioselectiva da polidatina por estes dois biocatalisadores, em solventes orgânicos adequados e utilizando diversos dadores de acilo, deu origem não só a derivados monoacilados, principalmente, mas também a derivados diacilados. Com efeito, os resultados obtidos indicam que tanto a CAL-B como a lipase PS possuem a capacidade de esterificar, selectivamente, um ou vários grupos hidroxilo da porção glicosilada da polidatina, originando mono- e diésteres com razoável regioselectividade e bons rendimentos.

A partir da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear bem como dos espectros de Infravermelho, foi possível verificar se os novos derivados sintetizados eram os pretendidos e localizar as posições de acilação na polidatina.

Na verdade, os resultados confirmam que tanto a CAL-B como a lipase PS dirigem preferencialmente a acilação na porção glicosídica da polidatina.



# Abstract

The glycosyl polyphenolic compounds are widely distributed in nature, being biologically active compounds, and also exhibit other interesting properties. In particular, stilbene glycosides, such as polydatin (substrate under study in this thesis), have numerous biological activities and are used in food, pharmaceutical and cosmetic preparations.

The modification of a specific functional group, of these polyphenolic glycosides by chemical methods revealed to be a complex task, so in this study, enzymatic methods were employed. Indeed, the latter provide an efficient process to obtain mono- and diacylated derivatives in good yields.

Furthermore, the increasing demand for chemical processes more acceptable from an environmental and economical point of view makes biocatalysis an attractive technological tool. Thus, the biological catalysis is often referred to as a "pillar" of Green Chemistry.

Additionally, enzymatic catalysis has many advantages which overcome many times their disadvantages. Hence it is use increasingly relevant in several areas, particularly in the pharmaceutical industry.

The overall objective of this work is to study the structural modifications of a glycosylated stilbene through biocatalysis, in order to improve its biological and pharmacological properties.

It was found that the two lipases tested, lipase B from *Candida antarctica* and *Pseudomonas cepacia* lipase, accept polydatin as a substrat.

Thus, the enzymatic regioselective acylation of polydatin by these two biocatalysts in suitable organic solvents and using various acyl donors, gave rise to not only monoacylated derivatives, mainly, but also diacylated derivatives. Indeed, the results indicate that both CAL-B and Lipase PS have the ability to esterify selectively one or more hydroxyl groups of the glycosylated portion of polydatin, yielding mono- and diesters with reasonable regioselectivity and good yields.

From the analysis of the Nuclear Magnetic Resonance spectra and Infrared spectra, it was possible to verify whether the new derivatives were synthesized and to locate the acyl in polydatin derivatives.

In fact, the results confirm that both CAL-B and lipase PS directed the acylation to the glycosidic portion of polydatin.



# Índice

I.	Introdução Geral .....	1
1.1.	Estilbenos .....	6
1.1.1.	Resveratrol .....	11
1.1.2.	Polidatina .....	15
2.	Biocatálise: princípios e aplicações .....	23
2.1.	Vantagens e inconvenientes do uso de enzimas como catalisadores .....	24
2.2.	Classificação das enzimas .....	25
2.3.	Mecanismo catalítico e aplicações sintéticas de hidrolases .....	26
2.3.1.	Mecanismo catalítico das lipases .....	28
2.3.2.	Dadores de acilo e nucleófilos aceites pelas hidrolases .....	30
2.3.3.	Selectividade das hidrolases .....	31
2.4.	Biocatálise em meios não convencionais .....	33
2.5.	A biocatálise no âmbito da Química Verde .....	37
2.6.	Síntese enzimática de derivados de compostos polifenólicos .....	38
2.6.1.	Os compostos polifenólicos em transformações selectivas .....	38
2.6.2.	Aplicação de hidrolases em transformações selectivas de compostos polifenólicos .....	39
3.	Objectivos do trabalho .....	46
II.	Parte Experimental .....	47
1.	Material e métodos .....	47
1.1.	Instrumentação .....	47
1.2.	Reagentes e solventes .....	47
1.3.	Acilação enzimática de grupos hidroxilo da polidatina .....	48
1.3.1.	Definição das condições de reacção de acetilação regioselectiva da polidatina 48	
1.3.1.1.	Ensaio de <i>screening</i> .....	48
1.3.2.	Ensaio em maior escala .....	49
1.3.2.1.	Síntese da polidatina 6''-monoacetato .....	49
1.3.2.2.	Síntese da polidatina 6''-monodecanoato .....	53
1.3.2.3.	Síntese da polidatina 6''-monobutirato .....	54
1.3.2.4.	Síntese da polidatina 2'',6''-dibutirato .....	55

1.3.2.5.	Síntese da polidatina 6''-monooleato .....	56
2.	Resultados e discussão .....	58
2.1.	Definição das condições de reacção de acetilação regioselectiva da polidatina ..	58
2.1.1.	Rastreio de enzimas e de solventes.....	59
2.2.	Reacções em maior escala .....	63
2.2.1.	Síntese enzimática e isolamento dos derivados mono- e diacilados da polidatina.....	63
2.2.1.1.	Síntese da polidatina 6''-monoacetato.....	65
2.2.1.2.	Síntese da polidatina 6''-monodecanoato.....	67
2.2.1.3.	Síntese da polidatina 6''-monobutirato.....	68
2.2.1.4.	Síntese da polidatina 2'',6''-dibutirato .....	68
2.2.1.5.	Síntese da polidatina 6''-monooleato .....	71
III.	Conclusões .....	73
IV.	Bibliografia.....	75
V.	Apêndices.....	101

# Índice de ilustrações

## Índice de figuras

- Figura 1** - a) Estrutura básica dos flavonóides, com a identificação dos respectivos anéis A, B e C e carbonos. b) Estrutura básica dos estilbenos, com a numeração dos respectivos carbonos. .... 2
- Figura 2** - Via fenilpropanóide da síntese dos estilbenos. (Adaptado de Chong *et al.*, 2009). .. 7
- Figura 3** - a) Estrutura fenantreno, com a numeração dos respectivos carbonos. b) Estrutura básica de estilbenos com estrutura catecol e numeração dos respectivos carbonos..... 10
- Figura 4** - Estrutura do *trans*-resveratrol..... 11
- Figura 5** - a) Estrutura do resveratrolósido e b) estrutura do piceatanol. .... 12
- Figura 6** - Estrutura do resveratrol glicosilado, também designado piceide ou polidatina, com a numeração dos respectivos carbonos..... 16
- Figura 7** - Mecanismo catalítico das lipases. (Adaptado de Muralidhar *et al.*, 2002). .... 29
- Figura 8** - Acetilação mediada pela *Chirazyme L-2* de um intermediário para a síntese de vitamina A, pela Roche, utilizando acetato de vinilo como agente acilante. (Adaptado de Paravidino e Hanefeld, 2011). .... 31
- Figura 9** - Estrutura da isoquercitrina e numeração dos respectivos carbonos. .... 41
- Figura 10** - Locais de acilação do peltatósido pela subtilisina, originando derivados mono- e diacilados..... 43
- Figura 11** - Acilação dos dois glicosídeos iridóides nas posições 3' e 6', utilizando a CAL-B como biocatalisador..... 44
- Figura 12** - Acilação regiosselectiva da mitramicina (ácido aureólico). Note-se os locais preferenciais de acilação tanto da CAL-A como da CAL-B..... 45
- Figura 13** - Estrutura da polidatina, com a numeração dos respectivos carbonos. Destaca-se o grupo hidroxilo primário (azul), os grupos hidroxilo secundários (verde) e os grupos hidroxilo fenólicos (vermelho). .... 58

<b>Figura 14</b> - Reacção de monoacilação regioselectiva da polidatina, aplicando a CAL-B como biocatalisador.....	64
<b>Figura 15</b> - Reacção de diacilação regioselectiva da polidatina, aplicando a CAL-B como biocatalisador. ....	64
<b>Figura 16</b> - Reacção de monoacilação regioselectiva da polidatina, aplicando a lipase PS como biocatalisador.....	64
<b>Figura 17</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ da polidatina com indicação da posição dos protões da porção glicosídica.....	65
<b>Figura 18</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ do produto 2a com indicação do desvio causado pela acilação da polidatina. ....	66
<b>Figura 19</b> - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monoacetato (produto 2a), aplicando a lipase PS como biocatalisador e o acetato de vinilo como agente acilante. ....	67
<b>Figura 20</b> - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monodecanoato (produto 4a), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o decanoato de vinilo como dador de acilo. ....	68
<b>Figura 21</b> - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monobutirato (produto 6a), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o butirato de vinilo como dador de acilo. ....	68
<b>Figura 22</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ da polidatina com indicação da posição dos protões da porção glicosídica.....	69
<b>Figura 23</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ do produto 7a com indicação do desvio causado pela acilação da polidatina. ....	69
<b>Figura 24</b> - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto 7a), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o butirato de vinilo como dador de acilo. ....	70
<b>Figura 25</b> - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monooleato (produto 12a), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o oleato de vinilo como dador de acilo. ....	71
<b>Figura 26</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ da polidatina (composto 1).....	101
<b>Figura 27</b> - Espectro RMN $^{13}\text{C}$ da polidatina (composto 1).....	102
<b>Figura 28</b> - Espectro IV da polidatina (composto 1).....	103

<b>Figura 29</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ da polidatina 6''-monoacetato (produto 2a).....	104
<b>Figura 30</b> - Espectro RMN $^{13}\text{C}$ da polidatina 6''-monoacetato (produto 2a). .....	105
<b>Figura 31</b> - Espectro IV da polidatina 6''-monoacetato (produto 2a) com indicação do grupo carbonilo.....	106
<b>Figura 32</b> - Espectro RMN $^1\text{H}$ da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto 7a).....	107
<b>Figura 33</b> - Espectro RMN $^{13}\text{C}$ da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto 7a).....	108
<b>Figura 34</b> - Espectro IV da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto 7a) com indicação do grupo carbonilo.....	109

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Ensaio de <i>screening</i> das condições reaccionais para a acetilação enzimática da polidatina, usando 2 mg de substrato e 2 mg de catalisador em 0,9 mL de solvente, na presença de 0,1 mL de agente acilante.....	49
<b>Tabela 2</b> - Acilação regioselectiva da polidatina com diversos dadores de acilo catalisados por CAL-B, usando acetona como solvente.....	52
<b>Tabela 3</b> - Massas iniciais de substrato utilizadas e massas finais de produto obtidas em cada reacção, em maior escala, com o respectivo rendimento e o ponto de fusão de cada reacção. 57	
<b>Tabela 4</b> - Ensaio de <i>screening</i> com indicação da enzima, solvente e dador de acilo utilizados em cada ensaio e os respectivos resultados, após 96h. ....	60





# I. Introdução Geral

## 1. Compostos polifenólicos

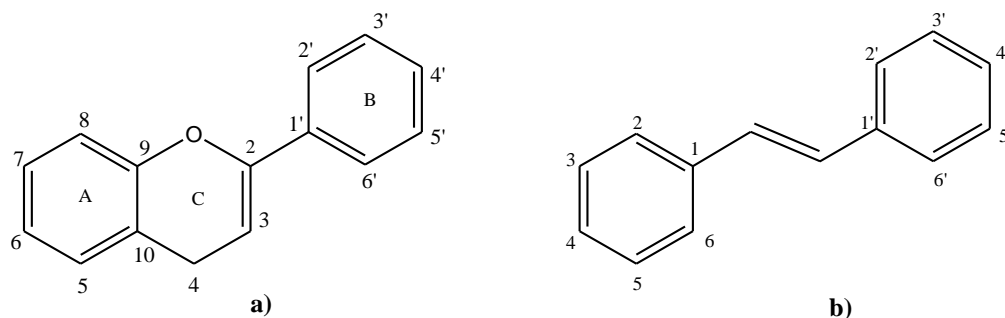
Os compostos polifenólicos caracterizam-se por possuírem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo (Dai e Mumper, 2010) e derivam de um intermediário comum, a fenilalanina, ou do seu precursor, o ácido chiquímico (Yang *et al.*, 2001). São amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabolitos secundários mais abundantes nas plantas, com mais de oito mil estruturas fenólicas actualmente conhecidas, que vão desde moléculas simples até substâncias muito polimerizadas (Dai e Mumper, 2010). Visto que os polifenóis são omnipresentes em todos os órgãos das plantas, constituem uma parte integrante da alimentação humana (Yang *et al.*, 2001; Dai e Mumper, 2010). Portanto, os compostos fenólicos são constituintes gerais de alimentos de origem vegetal (frutas, legumes, cereais, azeite, etc.) e de bebidas (chá, café, cerveja, vinho, etc.), sendo parcialmente responsáveis pelas propriedades organolépticas globais dos alimentos vegetais (Dai e Mumper, 2010).

Uma vez formados, os compostos polifenólicos das plantas estão sujeitos à oxidação por tirosinases, presentes nas células das plantas (Regev-Shoshani *et al.*, 2003), enzimas essas que neutralizam as actividades biológicas dos primeiros (Espin e Wichers, 2000; Fan e Mattheis, 2001; Gilly *et al.*, 2001). Contudo, estes compostos protegem as plantas contra a radiação ultravioleta (*stress* fotossintético) (Yang *et al.*, 2001; Dai e Mumper, 2010), as espécies reactivas de oxigénio (ROS), as agressões por agentes patogénicos, bem como contribuem para dar cor às plantas (Dai e Mumper, 2010). De facto, os polifenóis das plantas são importantes sistemas de defesa e antioxidantes das mesmas (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos podem ser agrupados em inúmeras classes que se diferenciam, primeiramente, pela complexidade do esqueleto de base (começando com um simples C6 até formas muito polimerizadas); seguidamente, pelo grau de alterações desse esqueleto (grau de glicosilação, hidroxilação, metilação e oxidação), e, por fim, pelas ligações possíveis dessas moléculas de base com outras moléculas (glúcidos, lípidos, proteínas ou outros metabolitos secundários que podem ser ou não compostos fenólicos) (Macheix *et al.*, 2005).

Deste modo, os compostos fenólicos incluem os flavonóides (figura 1 a), os estilbenos (figura 1 b), os ácidos fenólicos, os taninos, as lignanas, entre outros (Regev-Shoshani *et al.*,

2003; Dai e Mumper, 2010). Os flavonóides são os polifenóis mais abundantes na nossa alimentação (Dai e Mumper, 2010). Os primeiros são divididos em seis subgrupos: flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas, de acordo com o estado de oxidação do anel central C (Dai e Mumper, 2010). Além disso, os estilbenos hidroxilados são um dos grupos de compostos polifenólicos mais interessantes e terapeuticamente importantes (Kerem *et al.*, 2006 a).



**Figura 1 - a)** Estrutura básica dos flavonóides, com a identificação dos respectivos anéis A, B e C e carbonos. **b)** Estrutura básica dos estilbenos, com a numeração dos respectivos carbonos.

Através da alimentação, os compostos polifenólicos exercem efeitos benéficos sobre a saúde humana (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Porém, a ingestão de quantidades excessivas de polifenóis pode ser tóxica, mesmo que sejam provenientes de fontes alimentares (Yang *et al.*, 2001). Assim, o facto da maioria destes compostos, provenientes da alimentação, ser absorvida e digerida de uma forma limitada pode ser considerado um mecanismo de protecção (Yang *et al.*, 2001).

É de referir que a ampla gama de efeitos biológicos, fisiológicos e farmacológicos (Cai *et al.*, 2006) exibidos pelos compostos polifenólicos é o resultado das suas poderosas propriedades antioxidantes *in vitro* (Sies, 2010) que, por sua vez, estão relacionadas com as estruturas desses compostos (Cai *et al.*, 2006). Com efeito, geralmente, a actividade antioxidante depende do número e das posições dos grupos hidroxilo e de outros substituintes, bem como da glicosilação das moléculas dos polifenóis (Cai *et al.*, 2006). Por exemplo, a presença de certos grupos hidroxilo no núcleo do flavonóide aumenta a sua actividade antioxidante, assim como os padrões de substituição nos anéis A e B, a dupla ligação 2,3 (insaturação) e o grupo 4-oxo no anel C também afectam a actividade antioxidante dos flavonóides (Cai *et al.*, 2006).

Há uma evidência crescente de que os compostos polifenólicos podem causar outros efeitos benéficos, independentes das suas capacidades antioxidantes, por influenciarem directamente as actividades de enzimas chave (Kerem *et al.*, 2006 b). Do mesmo modo, esses efeitos benéficos também podem estar relacionados com as propriedades lipofílicas dos polifenóis e, conseqüentemente, com as suas capacidades para penetrar na célula (Haraguchi, 2001).

Naturalmente, existe um grande interesse na elucidação dos benefícios para a saúde associados ao consumo de frutas e legumes ricos em fitoquímicos (Roupe *et al.*, 2006). Efectivamente, os compostos polifenólicos são os principais compostos bioactivos encontrados nas frutas e nos legumes que exibem actividades antioxidantes, anti-alérgicas, antiaterogénicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas (Bravo, 1998; Middleton *et al.*, 2000; Puupponen-Pimia *et al.*, 2001; Ajila *et al.*, 2007), antitumorais ou anti-carcinogénicas/antimutagénicas, antibacterianas, antivirais (Ajila e Prasada Rao, 2008), entre muitas outras.

Mais precisamente, demonstrou-se que uma alimentação rica em frutas e legumes, repleta de polifenóis, inibe a peroxidação lipídica (Esterbauer e Ramos, 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999; Marnett, 2000), reduz substancialmente o risco de desenvolver cancro e a mortalidade relacionada com o cancro (De Stefani *et al.*, 2004; Donaldson, 2004; Genkinger *et al.*, 2004; Nkondjock *et al.*, 2005) e retarda os efeitos do envelhecimento (como a aterosclerose) (Willet, 2001).

É de referir que vários estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre o consumo de frutas e legumes e a incidência de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Lanzilli *et al.*, 2012).

Os efeitos preventivos desses metabolitos secundários em termos de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e oncológicas, amplamente reportados, foram deduzidos a partir de dados epidemiológicos, bem como de dados experimentais *in vitro* e *in vivo* (Arts e Hollman, 2005; Cole *et al.*, 2005; Hertog *et al.*, 1994; Rasmussen *et al.*, 2005).

Relatou-se, igualmente, que as fracções polifenólicas de plantas podem causar efeitos semelhantes à insulina na utilização de glucose (Broadhurst *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 2003; Babu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005) e que, como os polifenóis são muitas vezes fortes quelantes do ferro, é possível que impeçam as reacções do tipo Fenton e, assim, a formação de radicais hidroxilo agressivos (Kurz *et al.*, 2008).

Nas plantas, os polifenóis encontram-se predominantemente na forma glicosilada, mas também na forma de metóxidos ou ligados a cadeias de ácidos gordos (Regev-Shoshani *et al.*,

2003). De facto, a maioria dos compostos polifenólicos são, geralmente, glicosilados pela glucose, ramnose, galactose e arabinose (Yang *et al.*, 2001).

É comum que os flavonóis que ocorrem naturalmente (por exemplo, a quercetina), possuem, pelo menos, um dos grupos hidroxilo, da aglicona polifenólica, glicosilado por mono- ou oligossacáridos (Alluis e Dangles, 2001). Outro exemplo, é o resveratrol, um estilbeno hidroxilado que ocorre naturalmente, também pode ser encontrado na forma glicosilada (Goldberg *et al.*, 1996) ou de metóxido (Langcake *et al.*, 1979), na natureza. Estes derivados glicosilados diferem das agliconas padrões não só nas suas actividades antioxidantes e biológicas, mas também nas suas biodisponibilidades e solubilidades na água (Goldberg *et al.*, 1996; Kuhnle *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2001; Stivala *et al.*, 2001; Stojanovic e Brede, 2002).

Com efeito, a glicosilação de polifenóis na natureza ajuda a proteger essas moléculas vitais da oxidação enzimática, estendendo as suas semi-vidas na célula, mantendo as suas capacidades antioxidantes benéficas e as suas propriedades biológicas bem como serve para aumentar as suas solubilidades (Vickery, M. L. e Vickery, B., 1981) e, eventualmente, as suas biodisponibilidades através dos transportadores de glucose localizados nas membranas das células (Gee *et al.*, 1998; Lim e Bowles, 2008).

A substituição de um ou vários grupos hidroxilo por uma glucose resulta numa afinidade muito menor das enzimas degradativas para o composto glicosilado (Regev-Shoshani *et al.*, 2003) e diminui as actividades do último quando comparado com a aglicona correspondente (Cai *et al.*, 2006). Por exemplo, a metilação ou a glicosilação na posição C-3 tem uma grande influência na afinidade da enzima para o seu substrato (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).

É comum os flavonóides naturais (por exemplo, a quercetina) possuírem, pelo menos, um dos seus grupos hidroxilo glicosilado por mono- ou oligossacáridos (Alluis e Dangles, 2001).

É curioso que a maioria dos polifenóis glicosilados (por exemplo, a polidatina, a genisteína e a daidzeína) são glicosilados nas posições menos importantes em termos da capacidade antioxidante (Goldberg *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 1998; Stojanovic e Brede, 2002). Por exemplo, o bloqueio do grupo hidroxilo na posição 7 da genisteína ou da daidzeína não afecta as suas capacidades antioxidantes, sugerindo que a presença de um grupo hidroxilo na posição C-7 tem um efeito insignificante nas actividades antioxidantes destes compostos (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Por outro lado, a substituição do grupo hidroxilo na posição C-

4' no anel B do flavonóide demonstrou ter um efeito dramático na sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica (Arora *et al.*, 1998).

Os polifenóis são estruturas hidrofóbicas exibindo uma má absorção por via oral, o que resulta numa concentração plasmática muito baixa (Biasutto *et al.*, 2009). A modificação das propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade e o coeficiente de partição, pela glicosilação parece exercer uma influência positiva na entrada dos polifenóis no interior dos enterócitos (Ratnam *et al.*, 2006).

Os compostos polifenólicos e os seus glicosídeos são submetidos ao metabolismo enzimático e microbiano no tracto gastrointestinal e no fígado antes de atingir a circulação sistémica (Spencer *et al.*, 2001; Silberberg *et al.*, 2006). De facto, os compostos glicosilados precisam de ser convertidos nas respectivas agliconas (na parede intestinal) antes de serem absorvidos para a circulação sanguínea (Torres *et al.*, 2011). Constata-se que, dependendo do padrão de glicosilação, a presença de uma mistura de compostos glicosilados pode levar a uma maior permanência dos polifenóis e dos seus metabolitos nos níveis circulatórios, bem como a uma maior permanência necessária para a hidrólise completa dos diferentes compostos glicosilados no tracto intestinal (Torres *et al.*, 2011). Após a absorção, as agliconas dos polifenóis são conjugadas com sulfato ou glucuronato nos enterócitos do intestino e no fígado (Hollman, 2004; Lucas *et al.*, 2009).

Os compostos polifenólicos tornaram-se muito atraentes para alguns investigadores e fabricantes de alimentos, devido às suas importantes propriedades antioxidantes, a sua abundância na alimentação e aos seus efeitos na prevenção de várias doenças associadas, entre outras, ao *stress* oxidativo (Manach *et al.*, 2004). Além disso, os polifenóis modulam a actividade de uma ampla variedade de receptores e, para além das suas propriedades antioxidantes, exercem diversas outras acções biológicas específicas na prevenção e no tratamento de doenças (Dai e Mumper, 2010).

## 1.1. Estilbenos

Ao longo do tempo, as plantas têm elaborado uma vasta gama de produtos naturais que evoluíram, conferindo vantagens selectivas contra as ameaças ambientais (Chong *et al.*, 2009). Especificamente, os fenilpropanóides são uma grande família de metabolitos secundários envolvidos na protecção de plantas contra os vários *stresses* ambientais, bióticos e abióticos (Dixon e Paiva, 1995).

Muitos fenilpropanóides são compostos antimicrobianos e a sua síntese é estimulada em resposta a vários tipos de *stress*, tais como a luz ultravioleta (UV) e as infecções fúngicas (nas folhas e nas cascas dos frutos) (Hart, 1981; Jeandet *et al.*, 1991), classificando-se como fitoalexinas (Chong *et al.*, 2009). Além disso, os fenilpropanóides sinalizam as respostas de defesa, protegem a planta contra os danos da luz UV e aumentam a biodisponibilidade de nutrientes (Dixon e Paiva, 1995).

Os estilbenos são pequenos compostos, com um peso molecular entre 210 e 270 g/mol, que ocorrem naturalmente e caracterizam-se por um esqueleto 1,2-di-fenil-etileno (Roupe *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2009). Estes compostos são muitas vezes referidos como fitoalexinas (Morales *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 2002), devido às suas acções protectoras (Cos *et al.*, 2003). Com efeito, estes metabolitos secundários actuam como agentes de protecção da planta contra os ataques microbianos e virais, a exposição excessiva à luz ultravioleta e diversas doenças (Bavaresco *et al.*, 1999).

Além dos seus papéis como fitoalexinas, os oligómeros ou os polímeros dos estilbenos podem participar no processo de reforço da parede celular em resposta à infecção (Chong *et al.*, 2009).

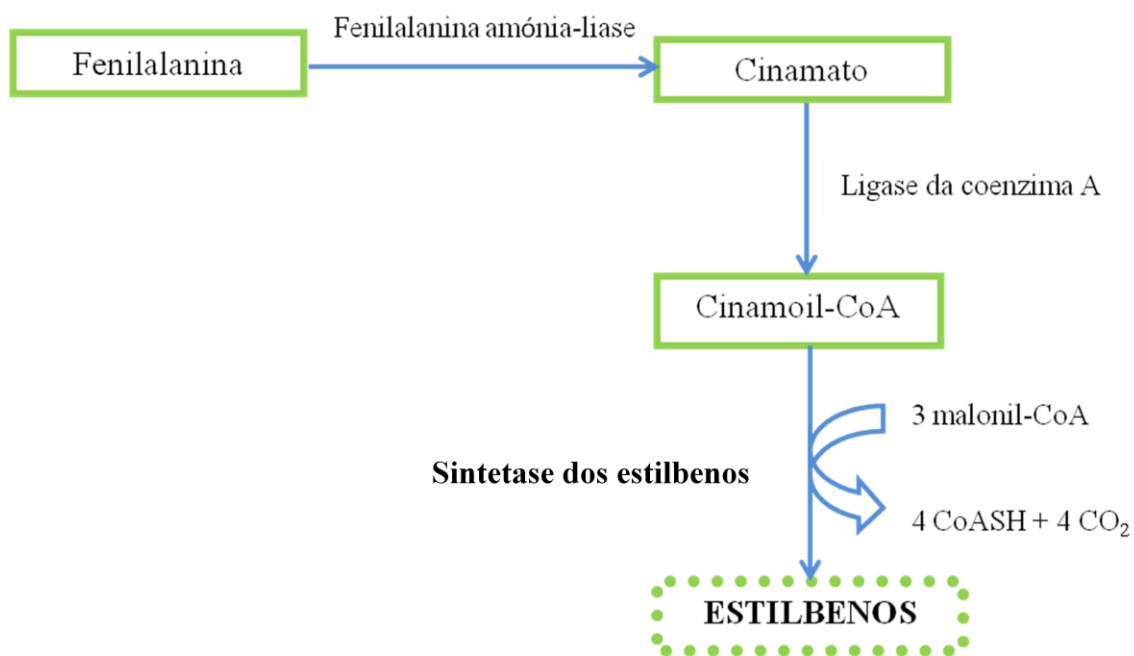
A síntese e a secreção dos estilbenos ocorrem no fruto e/ou nas folhas do seu hospedeiro (Roupe *et al.*, 2006), onde se pensa que os estilbenos estão armazenados no interior das células sob a forma de glicósidos (Ribeiro de Lima *et al.*, 1999). Na verdade, nestes órgãos, a biossíntese de estilbenos é induzida em resposta a uma variedade de factores de *stresses* bióticos e abióticos, com consequente aumento da transcrição de genes biossintéticos dos estilbenos e da acumulação de enzimas correspondentes (Lanz *et al.*, 1990; Rosemann *et al.*, 1991).

Assim, após a ameaça ambiental, o hospedeiro da planta activa a via do fenilpropanóide e, por conseguinte, as estruturas dos estilbenos são produzidas e segregadas (Roupe *et al.*, 2006). Destaca-se que a produção de um estilbeno específico depende em

grande parte do seu hospedeiro, da região de origem e dos estímulos ambientais (Roupe *et al.*, 2006).

Os elevados teores de estilbenos, que pré-existem em algumas plantas ou que são sintetizados após um ataque microbiano, são parte de ambas as respostas de defesas constitutivas e induzidas (Chong *et al.*, 2009). Efectivamente, a resistência a agentes patogénicos conduz a estes tipos de respostas de defesa (Chong *et al.*, 2009).

A sintetase dos estilbenos (STS), a enzima que catalisa, numa única reacção, a biossíntese do esqueleto do estilbeno a partir de três malonil-CoA e de um éster CoA de um derivado do ácido cinâmico, mais frequentemente o cinamoil-CoA ou o *p*-coumaroil-CoA (figura 2), evoluiu num número limitado de espécies de plantas e por isso poucas espécies de plantas têm a capacidade de produzir estilbenos (Chong *et al.*, 2009). No entanto, as enzimas STS podem aceitar diferentes derivados do ácido cinâmico como substratos e uma única enzima pode ser responsável pela biossíntese de estilbenos diferentes, dependendo da molécula inicial (Chong *et al.*, 2009). Seguidamente, os estilbenos podem ser submetidos a diferentes tipos de modificações como a glicosilação, a metoxilação, a oligomerização e outros (Chong *et al.*, 2009).



**Figura 2** - Via fenilpropanóide da síntese dos estilbenos. (Adaptado de Chong *et al.*, 2009).

Existem vários estilbenos que foram reconhecidos e classificados. Todavia, muitos estilbenos continuam por identificar (Roupe *et al.*, 2006).

Os estilbenos que ocorrem naturalmente existem na forma *trans* (Jayatilake *et al.*, 1993; Roupe *et al.*, 2006) mais estável, ainda assim poucos estudos referem a existência de estilbenos na forma *cis* (Jayatilake *et al.*, 1993).

A maioria dos estilbenos nas plantas deriva da unidade básica do *trans*-resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno), embora outras estruturas sejam encontradas em famílias de plantas particulares (Chong *et al.*, 2009).

Os estilbenos ocorrem naturalmente em várias famílias de plantas (Hart, 1981) incluindo *Vitaceae* (uvas), *Pinaceae* (pinhas), *Fabaceae* (amendoins), *Poaceae* (sorgos) e *Polygonaceae* (Chong *et al.*, 2009), mas as uvas e os produtos relacionados (como o vinho) são considerados as fontes alimentares mais importantes (Goldberg, 1995 a; Mattivi *et al.*, 1995; Ribeiro de Lima *et al.*, 1999; Waffo-Tégou *et al.*, 2001 b). De facto, as maiores concentrações de estilbenos encontram-se nos vinhos tintos (Waffo-Tégou *et al.*, 2001 b). Porém, a quantidade de estilbenos encontradas nos vinhos brancos é cerca de um terço daquela do vinho tinto (Carando *et al.*, 1999) mas, as quantidades dos estilbenos variam consideravelmente nos diferentes tipos de vinho (Ribeiro de Lima *et al.*, 1999).

Nas plantas, as concentrações de estilbenos estão influenciadas por uma variedade de factores diferentes que podem ser agrupados em factores de pré-colheita e de pós-colheita. Durante a pré-colheita, os factores importantes são a genética das plantas, as práticas agrícolas, o clima, a exposição à luz, as pragas e o manuseamento das pragas, a fertilidade do solo, a época da colheita e a maturação da planta (Roupe *et al.*, 2006). Por outro lado, durante a pós-colheita, os factores importantes são o armazenamento e o processamento industrial (Benbrook, 2005).

Salienta-se que vários estilbenos estão presentes no vinho principalmente sob a forma glicosídica, podendo ser hidrolisados por glicosidases no tracto gastrointestinal humano (Goldberg, 1995 b, 1995 c).

Adicionalmente, os estilbenos encontram-se numa ampla gama de alimentos, de fontes vegetais, de produtos de aromaterapia e de suplementos alimentares (Roupe *et al.*, 2006).

Os estilbenos e os seus derivados possuem uma variedade de actividades biológicas e farmacológicas (Jayatilake *et al.*, 1993) que incluem uma forte actividade antioxidante (Mérillon *et al.*, 1997; Waffo-Tégou *et al.*, 1998), bem com actividades antifúngicas



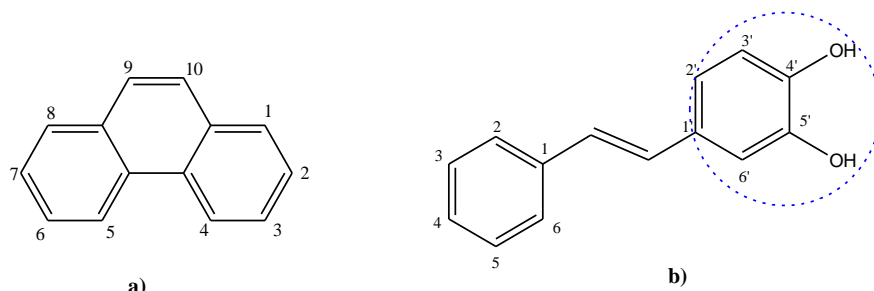
(Delaunois *et al.*, 2009), antimicrobianas, quimiopreventivas do cancro (Chong *et al.*, 2009), entre outras.

Mais especificamente, estes compostos têm um potencial terapêutico na doença isquémica do coração, na aterosclerose e no cancro (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Jang *et al.*, 1997), mas também eliminam os radicais livres (Waffo-Tégou *et al.*, 1998; Privat e Telo, 2002), atrasam o início do tumor em ratinhos transgênicos (Clifford *et al.*, 1996), inibem a oxidação das lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL) (Frankel *et al.*, 1993 b; Fauconneau *et al.*, 1997) e a agregação das plaquetas (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Varache-Lembège *et al.*, 1996; Orsini *et al.*, 1997 b).

Além disso, estudos epidemiológicos mostraram que o consumo moderado de vinho está relacionado com a diminuição de doenças cardiovasculares (St Léger *et al.*, 1979; Renaud e de Lorgeril, 1992; Gronbaek *et al.*, 1995), a inibição do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (Waffo-Tégou *et al.*, 2001 a), entre outras mencionadas anteriormente. Na verdade, estes potenciais efeitos benéficos dos estilbenos presentes no vinho devem-se às suas propriedades antioxidantes activas (Frankel *et al.*, 1993 a; Teissedre *et al.*, 1996).

É de referir que os estilbenos ciclizados com uma estrutura fenantreno (figura 3 a) exibem uma actividade antioxidante muito mais forte do que os compostos não-ciclizados correspondentes (Chong *et al.*, 2009). Em certos estilbenos, a conjugação entre os anéis A e B através de uma estrutura insaturada planar C2 permite uma deslocalização de electrões através das moléculas para a estabilização do radical, o que explica também as propriedades antioxidantes relativas destes compostos (Waffo-Tégou *et al.*, 1998).

Adicionalmente, em alguns estilbenos, a presença de um grupo hidroxilo complementar no anel B (estrutura catecol) (figura 3 b) aumenta significativamente o efeito de eliminação de radicais e as suas propriedades antioxidantes (Fauconneau *et al.*, 1997; Waffo-Tégou *et al.*, 1998). Assim, a estrutura catecol é essencial para as actividades antioxidantes dos estilbenos, como relatado por Rice-Evans e colaboradores para os flavonóides (Rice-Evans *et al.*, 1995).

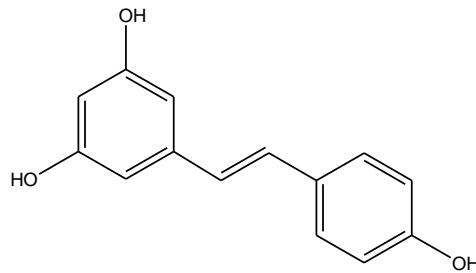


**Figura 3** - a) Estrutura fenantreno, com a numeração dos respectivos carbonos. b) Estrutura básica de estilbenos com estrutura catecol e numeração dos respectivos carbonos.

Note-se também que, o número e a posição dos substituintes hidroxilo parecem desempenhar um papel importante no efeito inibitório dos estilbenos hidroxilados, em particular, sobre a actividade da tirosinase (Mi Kim *et al.*, 2002).

É importante referir que as formas E e Z dos estilbenos apresentam diferentes actividades farmacológicas. Com efeito, a forma Z exibe uma maior actividade biológica comparada com a forma E, em vários ensaios anticancerígenos e antioxidantes (Roupe *et al.*, 2006). Em particular, verifica-se que a glicosilação dos estilbenos E reduz as suas actividades quando comparado com as agliconas correspondentes, o que é menos importante na estrutura Z (Waffo-Tégou *et al.*, 1998). Da mesma maneira, o bloqueio do grupo hidroxilo 4', no anel B, por uma porção glicosilada diminui drasticamente a actividade antioxidante quando comparado com a glicosilação na posição 3 do anel A (Waffo-Tégou *et al.*, 1998). Contrariamente, outros autores estipulam que a incorporação de uma porção glicosilada na posição 3 do anel A provoca uma perda de actividade antioxidante mais pronunciada do que na posição 4' do anel B (Torres *et al.*, 2011). Contudo, os compostos glicosilados precisam de ser convertidos nas agliconas antes de serem absorvidos, o que minimiza tal efeito (Torres *et al.*, 2011).

Como já foi referido, a maioria dos estilbenos nas plantas deriva da unidade básica do *trans*-resveratrol (Chong *et al.*, 2009). De facto, o *trans*-resveratrol é o estilbeno mais estudado mas, também, o *trans*-piceide (o seu glicósido) (Kerem *et al.*, 2006 a), a astringina, o piceatanol, o resveratrolósido, o *trans*-pteroestilbeno e a rapontina são estilbenos comuns das plantas (Chong *et al.*, 2009).



**Figura 4** - Estrutura do *trans*-resveratrol.

### 1.1.1. Resveratrol

O resveratrol, 3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno (figura 4), é o estilbeno mais conhecido e mais estudado. É composto por um núcleo estilbeno com três grupos fenólicos nas posições 3, 5 e 4' (Torres *et al.*, 2011).

O resveratrol é uma molécula planar, contendo porções de *p*-hidroxifenilo e de *m*-di-hidroxifenilo ligadas na conformação *trans* ao fragmento do eteno (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).

O resveratrol existe tanto como isómero *trans*- e *cis*-, mas numerosos relatórios sugerem que o *trans*-resveratrol é a forma termodinamicamente mais estável na natureza (Hanzlikova *et al.*, 2000; Stivala *et al.*, 2001) e mais bioactiva (Lanzilli *et al.*, 2012). No entanto, o *trans*-resveratrol pode ser convertido no *cis*-resveratrol quando exposto à luz UV (Lanzilli *et al.*, 2012).

O resveratrol está presente em várias fontes alimentares, tais como nas uvas (Jeandet *et al.*, 1995 a), no vinho (Cantos *et al.*, 2003), nos amendoins (Liu *et al.*, 2003) e em muitas frutas, tais como amoras (Lu e Serrero, 1999), mirtilos (Lyons *et al.*, 2003; Rimando *et al.*, 2004), groselha vermelha, morangos (Ehala *et al.*, 2005), etc. mas também no *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc (Wang *et al.*, 2007). Contudo, pensa-se que o vinho tinto é a fonte principal de resveratrol na alimentação humana (Lu e Serrero, 1999).

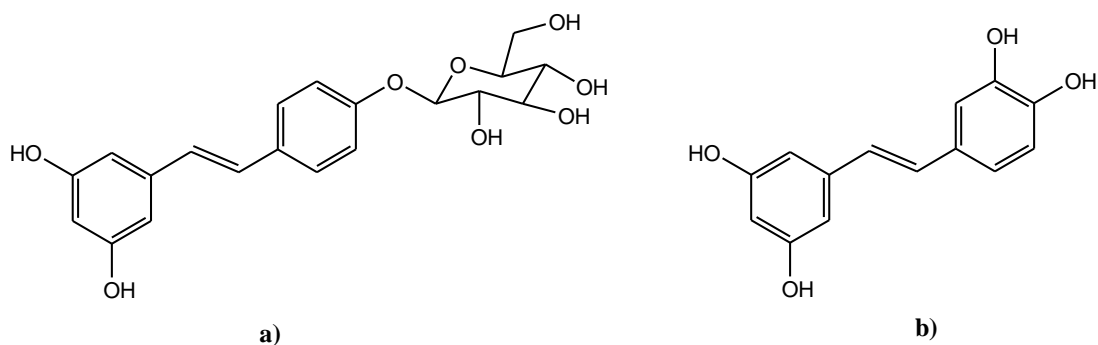
O resveratrol é biossintetizado nas plantas em resposta a condições de *stress*, isto é, lesões, exposição à luz UV, ataques por agentes patogénicos, infecções, entre outras (Fritzemeier e Kindl, 1981; Gonzalez-Barrio *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2010). Assim, esta

fitoalexina exerce um mecanismo de defesa do seu hospedeiro (Fritzemeier e Kindl, 1981; Dercks e Creasy, 1989 a; Gonzalez-Barrio *et al.*, 2009).

Os autores Langcake e Pryce também consideram como fitoalexinas, todos os produtos de oxidação do resveratrol como dímeros, trímeros e mais oligômeros altamente polimerizados do resveratrol, conhecidos como as viniferinas (Langcake e Pryce, 1977). Estas fitoalexinas são, do mesmo modo, produzidas em resposta a diferentes tensões bióticas e abióticas (Jeandet *et al.*, 2002).

Nas videiras sensíveis, o resveratrol é sintetizado em grandes quantidades logo após a infecção, mas é rapidamente glicosilado num composto não tóxico, o piceide. Contudo, nas variedades resistentes, o resveratrol é também sintetizado em grandes quantidades no local de infecção, mas, devido ao ambiente químico, é rapidamente oxidado em viniferinas tóxicas (Pezet *et al.*, 2004). Com efeito, o resveratrol não é um composto muito tóxico devido ao seu caráter hidrofílico (Dercks e Creasy, 1989 b; Pezet e Pont, 1995).

Tal como ocorre com os flavonóides (Hollman, 2004; Lucas *et al.*, 2009), o resveratrol está presente nas plantas, ligado a açúcares, como  $\beta$ -glicosídeos (Torres *et al.*, 2011). Assim, vários derivados do resveratrol foram identificados nas raízes de *Polygonum cuspidatum* tais como o piceide, o resveratrolósido e o piceatanol (figura 5) (Torres *et al.*, 2011).



**Figura 5 - a)** Estrutura do resveratrolósido e **b)** estrutura do piceatanol.

A presença de resveratrol em vinhos comerciais (predominantemente no vinho tinto) foi primeiramente observada por Siemann e Creasy (Siemann e Creasy, 1992), descoberta essa que levou a um grande interesse nas suas actividades biológicas. Tornou-se claro que além do isómero *trans*, outras formas deste tri-hidroxiestilbeno também estavam presentes no vinho tinto (Lamuela-Raventos e Waterhouse, 1993; Mattivi, 1993; Sbaghi *et al.*, 1996). Assim, descobriu-se o *cis*-resveratrol, que em certos vinhos encontra-se em concentrações

mais elevadas do que o isómero *trans* (Golberg *et al.*, 1995). Igualmente, identificou-se o piceide, o glicosídeo do *trans*-resveratrol (Jeandet *et al.*, 1994; Roggero e Archier, 1994), bem como os seus isómeros (Golberg *et al.*, 1995; Lamuela-Raventos *et al.*, 1995).

O consumo moderado de vinho tinto provoca efeitos benéficos na saúde, os quais estão atribuídos a presença do resveratrol na casca das uvas (Seignur *et al.*, 1990; Siemann e Creasy, 1992).

Embora existam evidências de que o *trans*-resveratrol possui fortes actividades biológicas, está presente em pequenas quantidades no vinho comparado com um dos seus glicosídeos, o *trans*-piceide (Vitrac *et al.*, 2002). No entanto, a hidrólise deste derivado glicosilado, pelas  $\beta$ -glicosidasas, pode ocorrer nos locais principais de biotransformação, permitindo assim que a quantidade de *trans*-resveratrol, disponível a partir da alimentação, seja maior (Henry-Vitrac *et al.*, 2006).

O resveratrol é imediatamente transportado através de uma monocamada de células do cólon e é extensivamente metabolizado via sulfatação e glucuronidação (Kaldas *et al.*, 2003). Um dos problemas do resveratrol é a sua biodisponibilidade limitada devido ao seu rápido e extensivo metabolismo no fígado, o que resulta na modificação química dos grupos hidroxilo nas posições 3 e 4', produzindo os derivados 3-sulfato e 3-glucuronido (Kang *et al.*, 2009), bem como os derivados 4'-O-glucuronidos (Regev-Shoshani *et al.*, 2003), respectivamente.

É possível que, pelo menos, alguns dos metabólitos do resveratrol podem ser convertidos em resveratrol sob a acção de  $\beta$ -glucoronidasas, *in vivo* (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). É de notar que os metabólitos do resveratrol, os  $\beta$ -glucuronidos, são muito menos tóxicos do que o próprio resveratrol (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Assim, a glucoronidação do resveratrol pode ter um papel na desintoxicação, disposição e prolongamento da eficácia deste composto nos seres humanos (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).

Por outras palavras, a biodisponibilidade oral do resveratrol inalterado é próxima de zero devido ao seu rápido metabolismo, resultando numa pequena quantidade de resveratrol inalterado na circulação sistémica (Walle *et al.*, 2004). Pelo contrário, a quantidade dos metabólitos do resveratrol que se forma é elevada (Walle *et al.*, 2004).

Salienta-se que o resveratrol circulante tem uma semi-vida sérica baixa, de oito a quatorze minutos (Yu *et al.*, 2002) sendo amplamente distribuído nos tecidos do coração, do fígado e do rim, e é eliminado predominantemente através da excreção renal e biliar (Bertelli *et al.*, 1999).

Portanto, a absorção do resveratrol é de pelo menos 70%, com base em dados de excreção urinária (Walle *et al.*, 2004). Com efeito, a sua taxa de absorção é elevada para um composto polifenólico (Walle *et al.*, 2004).

Assim, um método para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol é proteger o seu grupo fenólico na posição 3 (Torres *et al.*, 2010). Com efeito, a modificação regioselectiva do grupo hidroxilo na posição 3 é de grande interesse (Kang *et al.*, 2009). Como os grupos fenólicos do resveratrol nas posições 3 e 4' exibem uma reactividade muito semelhante (os grupos fenólicos nas posições 3 e 5 são quimicamente equivalentes, visto o resveratrol ser uma molécula simétrica), a biocatálise está a ser explorada devido à grande selectividade das enzimas (Alcalde *et al.*, 2006), podendo ser um outro método para aumentar a biodisponibilidade deste estilbeno. Igualmente, outro método com esse fim é obter análogos ou derivados do resveratrol com actividade comparável que não podem ser sulfatados ou glucuronados (Torres *et al.*, 2010).

É importante referir que o grupo hidroxilo 4' (e não o grupo 3') é o grupo funcional mais importante neste composto, em termos de actividades antioxidantes (Stivala *et al.*, 2001; Stojanovic e Brede, 2002).

A modificação de propriedades físico-químicas, especificamente a solubilidade e o coeficiente de partição, por glicosilação pode exercer uma influência positiva na biodisponibilidade do resveratrol (Torres *et al.*, 2011).

Estudos de toxicidade, realizados para determinar se altas doses de resveratrol podem ser toleradas num modelo de rato (Roupe *et al.*, 2006), concluíram que a administração de uma dose elevada de resveratrol não produziu efeitos toxicológicos determináveis e, ainda, que o resveratrol parece ter uma grande margem de segurança (Juan *et al.*, 2002).

O resveratrol é amplamente utilizado na medicina, na alimentação e na cosmética devido às suas propriedades farmacológicas (Wang *et al.*, 2007). Em particular, o seu derivado *trans* atraiu especial atenção devido às suas propriedades biológicas *in vitro* (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).

Efectivamente, o resveratrol possui inúmeros benefícios para a saúde, apresentando actividades antioxidantes (Mèrillon *et al.*, 1997; Fremont *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Youdim *et al.*, 2002; Kerem *et al.*, 2006 a), anti-inflamatórias (Bertelli *et al.*, 1999; Martinez e Moreno, 2000; de la Lastra e Villegas, 2005; Geronikaki e Gavalas, 2006), cardioprotectoras (Price e Fenwick, 1985; Pace-Asciak *et al.*, 1995; Jang *et al.*, 1997; Pendurthi *et al.*, 1999;

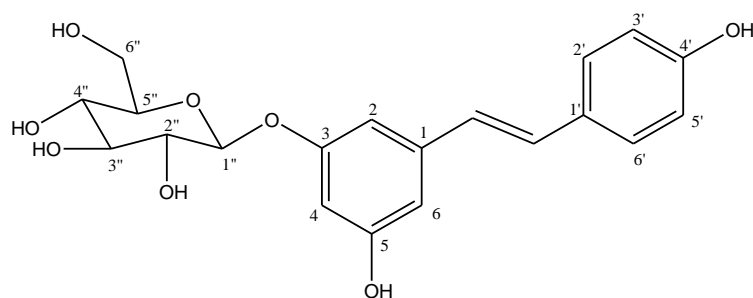
Hung *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001), anti-cancerígenas (Bertelli *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2002; Ursini e Sevanian, 2002), neuro-protectoras (Jung *et al.*, 2009), antitumorais (Larrosa *et al.*, 2004; Busquets *et al.*, 2007), imuno-moduladoras (King *et al.*, 2006), antifúngicas (Gonzalez Urena *et al.*, 2003), anti-carcinogénicas (Soleas *et al.*, 2001 b; Jang *et al.*, 1997), quimiopreventiva contra doenças cardiovasculares (Walle *et al.*, 2004), antimicrobianas (Kubo *et al.*, 1981), antifúngicas (Langcake *et al.*, 1979; Spencer *et al.*, 2003), antileucémicas (Mannila *et al.*, 1993), hepatoprotectoras (Kawada *et al.*, 1998), fitoestrogénicas (Schroeter *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2003), antienvelhecimento (Goldberg *et al.*, 1996), anti-HIV (Heredia *et al.*, 2000), entre outras.

Por conseguinte, o resveratrol manifesta uma vasta gama de actividades biológicas (Fang *et al.*, 2002). No entanto, as suas potenciais actividades biológicas *in vivo* são dependentes das suas absorções intestinais e do seu posterior acesso aos tecidos alvo (Henry-Vitrac *et al.*, 2006).

### **1.1.2. Polidatina**

A polidatina, 3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno-3- $\beta$ -mono-D-glucósido (figura 6), também conhecido como resveratrol glicosilado ou piceide, é um estilbeno natural (Hea *et al.*, 2007) que é principalmente extraído do tronco seco e da raiz de *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc, uma planta medicinal tradicional Chinesa (Shu, 2002). Na raiz e na rizoma de *P. cuspidatum*, a quantidade de polidatina é seis vezes superior à do resveratrol (Zhou *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2005).

Além de *Polygonum*, este estilbeno ocorre num variedade de plantas (Yu *et al.*, 2006), tais como *Picea* (Kariyone *et al.*, 1958) e *Eucalyptus* (Hills e Hasegawa, 1962). Este composto glicosilado é um dos estilbenos mais comuns na natureza (Li *et al.*, 2012) e é o derivado do resveratrol mais abundante (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).



**Figura 6** - Estrutura do resveratrol glicosilado, também designado piceide ou polidatina, com a numeração dos respectivos carbonos.

O piceide tem uma estrutura semelhante ao resveratrol, na qual uma glucose liga-se na posição C-3, substituindo assim um grupo hidroxilo (Lanzilli *et al.*, 2012). Esta substituição dá origem a alterações conformacionais da molécula, o que leva a alterações nas suas propriedades biológicas (Lanzilli *et al.*, 2012). De facto, a estrutura tridimensional do piceide é torcida ao longo da ponte do etano (Regev-Shoshani *et al.*, 2003), enquanto que a do resveratrol é planar, como foi discutido anteriormente.

A polidatina está presente principalmente nas uvas (casca) e nos produtos derivados das uvas (vinhos ou sumos) (Roggero e Archier, 1994; Waterhouse, 1994).

Alguns dados estabelecem que a polidatina é um constituinte importante dos vinhos tintos que, em diversas regiões, iguala ou exceda as concentrações de resveratrol livre (Goldberg *et al.*, 1996). Sabe-se que a polidatina é extraída dos frutos durante a fermentação e que alguma é convertida na correspondente aglicona, durante este processo (Goldberg *et al.*, 1996).

Vários factores (incluindo a expressão de genes, o clima e os procedimentos enológicos) pré-determinam e, subsequentemente, modulam as concentrações relativas e absolutas da polidatina e do resveratrol num vinho individual (Goldberg *et al.*, 1996). Efectivamente, alguns autores referem que as técnicas de vinificação, nomeadamente a maceração com as peles, têm efeitos importantes nos níveis de piceide e de resveratrol no vinho (Mattivi *et al.*, 1995; Jeandet *et al.*, 1995 b). Em particular, os agentes clarificantes e os filtros podem diminuir os níveis de piceide e de resveratrol (Lamuela-Raventos *et al.*, 1995; Soleas *et al.*, 1995; Tobella e Waterhouse, 1996; Vrhovsek *et al.*, 1997).

No vinho, os derivados do resveratrol que são detectados com maior frequência são o *trans*- e o *cis*-piceide e as suas agliconas, o *trans*- e o *cis*-resveratrol (Siemann e Creasy,



1992; Lamuela-Raventos *et al.*, 1995; Ribeiro de Lima *et al.*, 1999). Porém, em certos vinhos, as concentrações de *trans*- e de *cis*-piceide são tão elevadas que ultrapassam as das suas agliconas (Ribeiro de Lima *et al.*, 1999). Particularmente, no vinho tinto, o *trans*-piceide encontra-se em maiores concentrações seguido do *cis*-piceide e do *trans*-resveratrol (Romero-Pérez *et al.*, 1999; Henry-Vitrac *et al.*, 2006). Do mesmo modo, os isómeros *trans*-piceide e *cis*-piceide são os principais compostos que se encontram não só nos vinhos brancos (Romero-Pérez *et al.*, 1996) mas também nos sumos de uvas brancas (Langcake e Pryce, 1976; Jeandet *et al.*, 1991). Note-se que, nos sumos de uvas, a concentração do piceide é sete vezes a de resveratrol (Romero-Pérez *et al.*, 1999). Portanto, o sumo de uvas (principalmente o de uvas vermelhas) pode ser uma alternativa ao vinho, uma vez que ambos possuem propriedades benéficas semelhantes (Rimm *et al.*, 1996).

É de referir que, para a determinação dos isómeros da polidatina, o método mais utilizado é a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), visto ser um método sensível, preciso e específico (Hea *et al.*, 2007).

Como o transporte transepitelial do *trans*-piceide ocorre a uma taxa elevada, seguido da hidrólise no intestino delgado e no fígado, a quantidade de *trans*-resveratrol biologicamente activo resultante é elevada (Henry-Vitrac *et al.*, 2006). Este último pode sofrer um metabolismo adicional, tal como a conjugação com o ácido glucurónico no interior dos enterócitos (Henry-Vitrac *et al.*, 2006).

Por um lado, comparado com o resveratrol, a polidatina é mais resistente à oxidação enzimática, por isso tem uma maior biodisponibilidade (Fabris *et al.*, 2008; Lanzilli *et al.*, 2011, 2012). Além disso, a mudança conformacional deste estilbeno glicosilado pode ser um dos factores que contribui para o aumento da sua resistência à oxidação enzimática (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). No entanto, outros autores sugerem que a biodisponibilidade do piceide é muito mais baixa em comparação com a do resveratrol (Meng *et al.*, 2004). Também, outros dados indicam que o *trans*-piceide possui uma baixa biodisponibilidade nos humanos, uma vez que este possui boas capacidades na penetração de células e tem um metabolismo eficiente nas células de cólon humano (Henry-Vitrac *et al.*, 2006).

De acordo com Hollman e colaboradores (1995) e Paganga e Rice-Evans (1997), a absorção de alguns fenóis, a partir da alimentação, é reforçada pela conjugação com a glucose. Com efeito, o glicosídeo facilita a absorção no intestino, assim os piceides são absorvidos de forma mais eficiente do que as agliconas (Romero-Pérez *et al.*, 1999). Deste

modo, o *trans*-piceide poderá exercer a sua função benéfica de forma mais eficaz do que o *trans*-resveratrol (Ibern-Gómez *et al.*, 2000).

A glicosilação do resveratrol na posição 3 do anel A dá origem ao piceide, que tem uma actividade duas vezes menor para ambas as estruturas (E) e (Z) (Waffo-Tégou *et al.*, 1998). Sendo assim, a glicosilação dos isómeros dos estilbenos reduz as suas actividades quando comparadas com as agliconas correspondentes, isto é, piceide (E)- e (Z)- vs. resveratrol (E)- e (Z)- (Waffo-Tégou *et al.*, 1998).

Apesar disso, vários estudos propuseram que a polidatina tem propriedades biomédicas semelhantes às do resveratrol (Fabris *et al.*, 2008), pois demonstrou-se que este estilbeno glicosilado retém as actividades biológicas e farmacológicas deste último (Liang e Mo, 1996; Kimura e Okuda, 2000; Zhang *et al.*, 2008; Jin e Zhao, 2009).

O número e as posições dos grupos hidroxilo dos derivados do resveratrol desempenham um papel importante nas suas actividades biológicas (Soleas *et al.*, 2001 a; Stivala *et al.*, 2001; Stojanovic e Brede, 2002).

A polidatina exerce várias actividades biológicas, tais como actividades antimicrobianas, antivirais (Peng *et al.*, 2011), anticarcinogénicas (Soleas *et al.*, 2001 b; Jang *et al.*, 1997), hepatoprotectoras (Du *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2009), anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotectoras (Ji *et al.*, 2012), de anti-agregação plaquetária (Verrota *et al.*, 1994), ansiolíticas (Wang *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004), antidiabéticas (Gao *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004; Fei *et al.*, 2008), entre outras.

Especificamente, uma das principais actividades da polidatina é a sua actividade antimicrobiana (sobre o *Staphylococcus aureus* (Shu, 2002), o *Catarral coccus*, a *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2006), etc.) e antiviral (para o vírus da *Printcolor Branch* e o vírus do herpes simplex) (Zhang *et al.*, 2001).

Outras propriedades biológicas deste composto são as de inibir a agregação das plaquetas, eliminar os radicais livres (Peng *et al.*, 2011), aumentar o fluxo sanguíneo nos capilares (Shan, 1988; Aburjai, 2000), além de actuar como um agente tranquilizante (Wang *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004).

Segundo diversos autores, a polidatina tem um efeito anti-diabético (Gao *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004; Fei *et al.*, 2008) e indicam que este derivado do resveratrol pode proteger o miocárdio e as células do fígado de lesões (Shan *et al.*, 1990).

A polidatina tem efeitos evidentes na redução dos níveis sanguíneos dos triglicérides e do colesterol (Du *et al.*, 2009), estes últimos são atribuídos a sua capacidade de proteger o fígado e modular o metabolismo dos lípidos (Du *et al.*, 2009). Entretanto, este derivado do resveratrol pode ser utilizado no caso de doentes hiper-colesterolémicos com a complicação da obesidade, e pode desempenhar um papel importante na prevenção de doenças coronárias e da aterosclerose (Du *et al.*, 2009).

O resveratrol glicosilado, um dos constituintes do vinho tinto, é conhecido por reduzir a mortalidade de doenças coronárias e possui actividades de prevenção da aterosclerose (Shan *et al.*, 1990; Pace-Asciak *et al.*, 1995), bem como inibe a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (Frankel *et al.*, 1993 a) e a síntese de eicosanoides (Kimura *et al.*, 1985; Pace-Asciak *et al.*, 1995).

A polidatina exerce um efeito protector na isquemia cerebral, mas também nos danos da isquemia/reperfusão no pulmão e no coração (Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Este composto protege o cérebro de danos causados pela oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO), sendo este efeito realizado através da regulação da expressão de certas proteínas, assim como através da melhoria da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (Ji *et al.*, 2012). Além disso, a polidatina tem um efeito antioxidante e anti-inflamatório potente no tecido cerebral isquémico (Ji *et al.*, 2012). Portanto, o piceide pode modular a resposta inflamatória e antioxidante no córtex isquémico, durante a fase aguda do acidente vascular cerebral (AVC), e o seu papel protector pode estar relacionado com a regulação de certas proteínas (Ji *et al.*, 2012).

O piceide tem um potencial para atenuar a ruptura da BHE após a isquemia, apesar de este processo necessitar de ser mais estudado (Ji *et al.*, 2012).

Por conseguinte, a administração sistémica do piceide é neuroprotectora, levando a redução de danos oxidativos e inflamatórios, e a melhoria da permeabilidade da BHE após a pMCAO (Ji *et al.*, 2012).

Outro estudo mostrou que o resveratrol glicosilado tem um efeito benéfico no AVC através do aumento da pressão do pulso (Zhao *et al.*, 2003). Demonstrou-se que, no tratamento do AVC, a polidatina melhora a função cardíaca, nomeadamente com o aumento da microcirculação, dilatando o diâmetro das arteríolas, o que leva a um aumento da pressão do pulso (Zhu *et al.*, 1987; Zhao *et al.*, 1992).

O piceide também exhibe efeitos cardioprotectores (Li *et al.*, 2012). Com efeito, é usado no tratamento de algumas doenças cardíacas, incluindo a aterosclerose e a inflamação (Romero-Pérez *et al.*, 1999). Por exemplo, protege as células miocárdicas danificadas de privações de oxigénio e de glucose (Luo *et al.*, 1990; Miao *et al.*, 2011), com vista a melhorar a função cardíaca e a perfusão micro-circulatória em estado de choque, entre outros (Zhao *et al.*, 2003).

A polidatina exhibe um efeito protector na demência vascular, devido à sua actividade antioxidante e à protecção directa dos neurónios (Li *et al.*, 2012). De facto, este composto glicosilado tem um potencial terapêutico na aprendizagem e na perda de memória induzida pela hipoperfusão cerebral global crónica, e o seu possível mecanismo está relacionado com a actividade antioxidante (Li *et al.*, 2012). O piceide atenua as lesões dos neurónios induzidas por privação de glucose e de oxigénio (Li *et al.*, 2012). Por conseguinte, a polidatina tem a capacidade de reduzir as perdas cognitivas globais profundas induzidas pela isquemia (Li *et al.*, 2012).

Adicionalmente, a polidatina tem influência no metabolismo dos lípidos (Li *et al.*, 2012). Nomeadamente, é capaz de regular os lípidos e o teor de colesterol no sangue (Peng *et al.*, 2011). Estudos mostram também que este estilbeno pode aumentar a regulação da expressão da proteína secretora de células Clara (células epiteliais), causando a inibição da activação da fosfolipase A2 (enzima envolvida no processo inflamatório), e atenuar a lesão pulmonar induzida por lipo-polissacarídeos (Shu *et al.*, 2011).

As actividades antioxidantes do *trans*-resveratrol e do *trans*-piceide foram comparadas através da medição das suas acções inibitórias na peroxidação do ácido linoleico e da avaliação das suas capacidades para eliminar radicais perante o 2,2'-di-fenil-1-picril-hidrazilo (método DPPH) (Fabris *et al.*, 2008). Verificou-se que estes dois compostos têm uma capacidade antioxidante semelhante, possuindo um comportamento semelhante como inibidores da peroxidação lipídica (Fabris *et al.*, 2008). De facto, o *trans*-resveratrol e o *trans*-piceide são particularmente adequados na prevenção e no controlo da peroxidação lipídica das membranas, devido às suas lipofilicidades e à forma como se colocam na membrana, com os seus grupos hidroxilo suscetíveis junto às ligações duplas dos ácidos gordos poli-insaturados (Fabris *et al.*, 2008). Estes dois estilbenos apresentam um largo espectro de acção contra as lesões dos radicais, ou seja, um efeito preventivo potencial (Fabris *et al.*, 2008).

Num estudo acerca do efeito destes estilbenos sobre os miofibroblastos do fígado humano, verificou-se que o *trans*-piceide não modificou a morfologia dos miofibroblastos e não afectou o crescimento nem a expressão de  $\alpha$ -SMA (proteína envolvida na mobilidade, estrutura e integridade da célula), ao contrário do resveratrol (Godichaud *et al.*, 2000). Em suma, mostrou-se que uma única glicosilação do resveratrol induz a perda do seu efeito (Godichaud *et al.*, 2000).

A exposição de células do músculo liso arteriolar (ASMC) a polidatina, após o início de um choque grave, preserva a integridade mitocondrial destas células e tem um interessante potencial terapêutico (Wang *et al.*, 2012). O facto de este estilbeno proteger da disfunção mitocondrial das ASMC leva a uma elevada protecção contra a destabilização do eixo mitocondrial lisossomal e, assim, a redução da formação de espécies reactivas de oxigénio (Wang *et al.*, 2012). A polidatina restaura a microcirculação dos capilares durante o choque grave (Wang *et al.*, 2012).

Os isómeros do piceide têm propriedades semelhantes às do resveratrol na inibição da agregação plaquetária (Shan *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 1992; Varache-Lembège *et al.*, 1996; Orsini *et al.*, 1997 a) e na inibição da oxidação da LDL humana (Mérillon *et al.*, 1996). Também, o *trans*-piceide reduz as elevações dos níveis lipídicos e inibe a síntese dos eicosanoides (Kimura *et al.*, 1985), de uma forma menos activa que o *trans*-resveratrol (Romero-Pérez *et al.*, 1999).

Noutro estudo, onde foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de resveratrol e de piceide sobre os linfócitos normais humanos activados com um estímulo inflamatório, demonstrou-se que ambos os estilbenos diminuem a produção da interleucina-17 (IL-17), de uma forma dependente da concentração (Lanzilli *et al.*, 2012). Uma forte actividade inibitória (aproximadamente de 100%) foi obtida pelo tratamento com a polidatina (Lanzilli *et al.*, 2012). Por sua vez, o resveratrol, à mesma concentração, também induziu uma inibição significativa da produção da IL-17, embora o nível de inibição foi metade daquele observado com a polidatina (Lanzilli *et al.*, 2012). Portanto, a polidatina é mais eficaz na inibição da produção da IL-17 do que o resveratrol (Lanzilli *et al.*, 2012). Com efeito, este derivado glicosilado é mais resistente à oxidação enzimática do que o resveratrol, é solúvel em água e, ao contrário deste último que penetra na célula passivamente, o piceide entra na

célula através de transportadores de glucose, permitindo uma máxima absorção e uma maior biodisponibilidade (Fabris *et al.*, 2008; Mikulski e Molski, 2010).

Além dos seus efeitos farmacológicos, o piceide possui vastas aplicações na cosmética e na alimentação (Su *et al.*, 1995; Park e Lee, 2000) devido às propriedades físicoquímicas que o distinguem do resveratrol.

## 2. Biocatálise: princípios e aplicações

As enzimas são “conjuntos de proteínas que catalisam a química da vida” (Campbell, 1995; Nelson *et al.*, 2000; Walsh, 2001). De facto, as transformações químicas que ocorrem nos sistemas vivos são promovidas por inúmeras enzimas que catalisam a conversão de um conjunto de substratos em produtos específicos (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009).

Além disso, as enzimas contribuem para a sobrevivência e reprodução dos organismos (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009), apresentando propriedades especiais, nomeadamente elevadas selectividades, capacidade de aceitar uma grande variedade de moléculas complexas como substratos (Schmid, 2001) e de operar sob condições de reacção suaves, o que torna estas proteínas particularmente adequadas para a síntese e a modificação de produtos naturais (Riva, 2001).

É de notar que muitas enzimas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos que são dificilmente obtidos pelas vias químicas, assim como actuar em reacções nas quais não existem alternativas químicas viáveis (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009).

O aparecimento de tecnologias recentes, como por exemplo, a tecnologia do DNA recombinante, leva a uma crescente disponibilidade de enzimas (Bommarius e Riebel, 2004; García-Junceda *et al.*, 2004).

O termo biocatálise ou biotransformação abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009). Por outras palavras, a biocatálise utiliza enzimas, isoladas ou integradas em células, para catalisar reacções químicas. Com efeito, a biocatálise apresenta-se como uma ferramenta tecnológica atractiva frente a um aumento significativo da pressão relacionado com factores ambientais, económicos e o uso de fontes renováveis de energia, bem como da obtenção de matérias-primas puras (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009). Assim, a aplicação de enzimas como catalisadores para a síntese química, tornou-se uma alternativa preciosa para os químicos orgânicos (Schulze e Wubbolts, 1999).

A biotransformação é uma área interdisciplinar, pois a biologia, a química e a engenharia química são as três disciplinas necessárias para o sucesso da sua prática (Bommarius e Riebel, 2004). Adicionalmente, a biocatálise tem uma grande aplicação não só

na indústria química, farmacêutica, agroquímica e alimentar, mas também na medicina (análise e diagnóstico) e na biorremediação (recuperação do ambiente) (Bommarius e Riebel, 2004).

## **2.1. Vantagens e inconvenientes do uso de enzimas como catalisadores**

Os biocatalisadores devem obedecer a certos critérios, isto é, de actividade, estabilidade e selectividade que são comuns a qualquer catalisador.

As vantagens e desvantagens das enzimas como catalisadores para a síntese orgânica, derivam das suas próprias naturezas (García-Junceda *et al.*, 2004).

Por um lado, os catalisadores biológicos apresentam vantagens consideráveis na síntese orgânica. De facto, demonstram selectividades insuperáveis, pois são usados para conferir químio-, estéreo- ou regioselectividade a uma reacção, e conseguem fazer a diferenciação entre substratos enantioméricos (Bommarius e Riebel, 2004).

Adicionalmente, as enzimas são activas principalmente em condições suaves, operam a temperaturas ambientais, pH e pressões moderados e, preferencialmente, o meio reacional é a água (Bommarius e Riebel, 2004). Portanto, os biocatalisadores são ambientalmente benignos (García-Junceda *et al.*, 2004).

Além disso, os biocatalisadores são capazes de catalisar uma amplitude de reacções, nomeadamente aquelas aplicadas à escala industrial (Liese, 2000; Zaks, 2001; Straathof *et al.*, 2002). Cada vez mais, os catalisadores biológicos são combinados com catalisadores químicos ou utilizados numa cascata de reacções na célula (Bommarius e Riebel, 2004). Acrescenta-se que as enzimas permitem a biotransformação, em condições suaves, de compostos poli-funcionalizados e sensíveis, ao contrário dos processos químicos correspondentes que exigem condições reacionais rigorosas (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009).

Resumidamente, os biocatalisadores são catalisadores naturais, biodegradáveis, selectivos estáveis, versáteis, produtos de elevada qualidade, operam em condições reacionais suaves e catalisam reacções difíceis por métodos químicos convencionais.



Por outro lado, os catalisadores biológicos apresentam diversas desvantagens, tais como o facto de serem muitas vezes insuficientemente estáveis no meio reaccional, poucos existem para as reacções pretendidas (a partir de substratos disponíveis para os produtos alvo), apresentam por vezes especificidade restrita ao substrato, limitando a sua aplicação (García-Junceda *et al.*, 2004), bem como os ciclos de desenvolvimento são longos para obter novos e melhores catalisadores enzimáticos (Bommarius e Riebel, 2004).

## 2.2. Classificação das enzimas

Segundo o primeiro relatório da *Enzyme Commission* da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, a partir de 1961, todas as enzimas são classificadas em seis classes, dependendo do tipo de reacções catalisadas (Bommarius e Riebel, 2004). Deste modo, as principais classes de enzimas são divididas em sub-classes e sub-grupos. Cada enzima é classificada de forma sistemática, segundo o nome químico do substrato natural e o mecanismo de reacção (Boyce e Tipton, 2001).

Assim, as seis classes de enzimas são as **oxidoredutases (EC 1)**, as **transferases (EC 2)**, as **hidrolases (EC 3)**, as **liases (EC 4)**, as **isomerases (EC 5)** e as **ligases (EC 6)**.

De seguida, vai aprofundar-se especialmente a classe das hidrolases, pois são as enzimas em estudo neste trabalho.

As **hidrolases (EC 3)** catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C, P-O, entre outras. Na reacção inversa, catalisam a formação dessas ligações.

As lipases (catalisam a hidrólise de acilgliceróis), as proteases (catalisam a hidrólise de peptídeos) e as esterases (catalisam a hidrólise de ésteres) pertencem a esta classe de enzimas.

Todas as enzimas desta classe também podem ser classificadas como transferases, como cada reacção de hidrólise pode ser considerada como a transferência de um grupo químico específico para uma molécula de água. No entanto, devido à importância e ubiquidade da água nos processos naturais, estas são classificadas como hidrolases em vez de transferases.

É de notar que, as hidrolases dominam as aplicações biocatalíticas industriais (Bommarius e Riebel, 2004).

Seguidamente, na próxima secção (2.3), esta classe de enzimas será detalhada com mais pormenor.

### **2.3. Mecanismo catalítico e aplicações sintéticas de hidrolases**

As hidrolases são as enzimas mais comumente aplicadas em síntese orgânica e em processos industriais. Com efeito, compreendem a classe de enzimas com maior aplicação, uma vez que catalisam reacções de biotransformação com alta químio-, régio- e enantioselectividade (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009).

Além disso, as hidrolases possuem várias propriedades vantajosas, tais como disponibilidade em grandes quantidades, baixo custo, largo espectro de substratos aceites, não requerem cofactores (Carrea e Riva, 2000; Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009), e de um ponto de vista prático e económico, são atractivas, propriedades essas responsáveis pela sua aplicação generalizada (González-Sabín *et al.*, 2011).

A função destas enzimas é catalisar a hidrólise de uma variedade de substratos (péptidos, ésteres carboxílicos, epóxidos, etc.) e a maioria das hidrolases, especialmente as lipases (triacilglicerol acil hidrolases), podem operar em solventes orgânicos, catalisando processos de esterificação, *trans*-esterificação e aminólise (González-Sabín *et al.*, 2011).

As hidrolases apresentam uma grande variedade de aplicações diferentes, tais como em formulações de detergentes (Godfrey e West, 1996), na produção de alimentos (Jaeger e Reetz, 1998), na indústria de papel (Farell *et al.*, 1997), na química orgânica sintética (Boland *et al.*, 1991; Drauz e Waldmann, 1995), na obtenção de blocos de construção quirais a partir de misturas racémicas através da resolução cinética (Kumar, 2007), nos compostos pró-quirais (Drauz e Waldmann, 2002) e nas misturas diastéreo-isoméricas (Jones, 1986; Sih e Wu, 1989; Faber, 1997; Carrea e Riva, 2000; Koeller e Wong, 2001).

Adicionalmente, a aplicação de reacções enzimáticas, catalisadas por hidrolases, juntamente com a síntese química permite várias aplicações práticas e bem estabelecidas como, por exemplo, o uso de lipases na síntese do paclitaxel (Khlmejnitsky *et al.*, 1997).

Dentro da classe das hidrolases, as reacções catalisadas por lipases possuem uma grande importância biotecnológica (Jaeger *et al.*, 1999; Ghanem, 2007). Efectivamente, as lipases pertencem a um grande grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações éster de triacilgliceróis, processar gorduras ou actuar como detergentes (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009). Estão extensamente distribuídas em plantas, microrganismos e animais (Sarda e Desnuelle, 1958). Além disso, a sua relevância industrial resulta da sua acção numa multiplicidade de substratos, promovendo uma larga gama de reacções biocatalíticas (Brady *et al.* 1990).

As lipases são aplicadas em inúmeros processos na indústria farmacêutica, pois estas enzimas apresentam inúmeras vantagens, tais como alta especificidade e eficiência, promovem reacções selectivas, são disponíveis a baixo custo (Gonzaga de Oliveira e Mantovani, 2009), podem operar em meios não naturais e são fáceis de manipular (Carrea e Riva, 2000).

Assim, existe uma procura cada vez maior para identificar, caracterizar e produzir lipases para uma variedade de aplicações biotecnológicas, especificamente nas biotransformações enantio-selectivas (Jaeger, 1999).

As lipases são os biocatalisadores mais usados em biocatálise (Teng *et al.*, 2005), nomeadamente aplicam-se na modificação biocatalítica de flavonóides (Wang *et al.*, 2010), na indústria, em outros tipos de síntese orgânica e na resolução cinética de uma grande variedade de compostos quirais (Davis e Boyer, 2001).

De igual modo, tanto as lipases como as proteases possuem aplicações interessantes na acilação regioselectiva e desacilação de glúcidos (Riva, 2001). É de acrescentar que a utilização destas enzimas, em solventes orgânicos, constitui uma abordagem interessante para a protecção selectiva dos diferentes grupos hidroxilo do açúcar (Riva *et al.*, 1988; Carrea e Riva, 2000).

Recentemente, as lipases que possuem selectividade e estabilidade apreciáveis foram utilizadas na transformação de uma grande variedade de compostos orgânicos (Santaniello *et al.*, 1992). Particularmente, a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B, com o nome comercial *Novozym 435*) é uma enzima disponível comercialmente e é utilizada, por exemplo, na resolução de compostos racémicos (Orrenius *et al.*, 1995). De facto, a CAL-B é altamente estéreo-selectiva tanto na hidrólise (Jacobsen *et al.*, 2003) como na síntese de ésteres (Enaud *et al.*, 2004; Skupinska *et al.*, 2003; Teng *et al.*, 2005), sendo utilizada para acilar uma

variedade de substratos, incluindo produtos naturais, tais como os oligossacarídeos (Oosterom *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 2002), os diterpenos (Khmelnitsky *et al.*, 1997), os triterpenóides (Teng *et al.*, 2004), os flavonóides (Danieli *et al.*, 1993) e as saponinas dos esteróides (Yu *et al.*, 2001).

### 2.3.1. Mecanismo catalítico das lipases

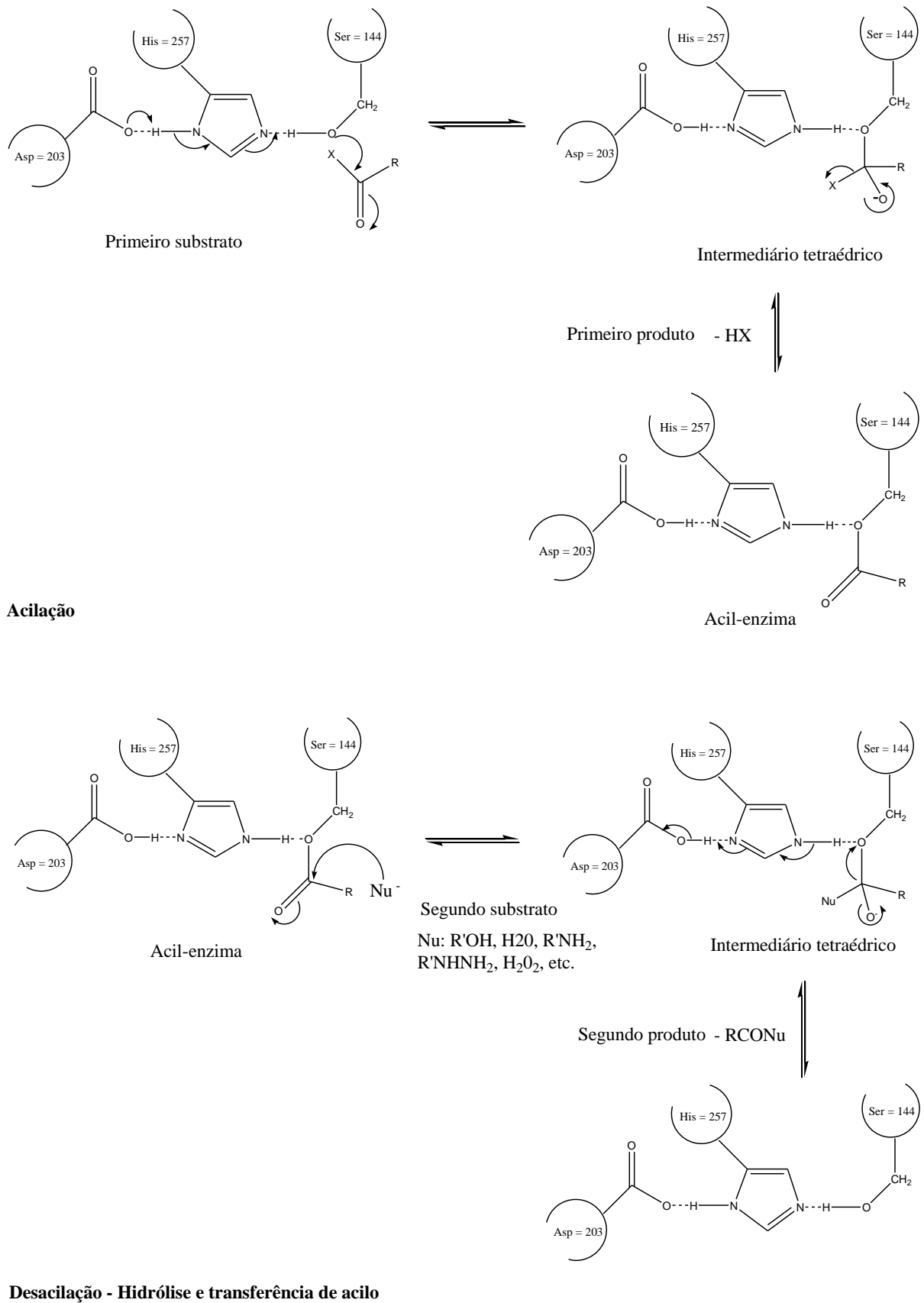
A maioria das hidrolases são serina-hidrolases. Com efeito, as lipases são as serina-hidrolases mais usadas actualmente em biocatálise e, também, possuem um mecanismo catalítico semelhante à das serina-proteases. Numerosas lipases necessitam de activação interfacial para expor o centro activo e a tríade catalítica destas enzimas é constituída por aspartato (ou glutamato), histidina e serina, actuando como um sistema de *charge relay* (Brady *et al.*, 1990; Bommarius e Riebel, 2004 b).

A primeira etapa do mecanismo catalítico das lipases, a acilação, inicia-se com o carboxilato do resíduo do ácido aspártico que estabelece uma ponte de hidrogénio com a histidina, de seguida o azoto da histidina liga-se ao álcool da serina ainda por uma ponte de hidrogénio. O resultado deste sistema de cedência de carga é o oxianião da serina que ataca o carbono carbonílico do primeiro substrato ( $R_1\text{-CO-OR}_2$ ), formando a acil-enzima (intermediário tetraédrico) e libertando o primeiro produto ( $\text{HOR}_2$ ).

Na segunda etapa, a desacilação, o grupo acilo é transferido para o segundo substrato ( $\text{HOR}_3$ ), muitas vezes a água, que reage de seguida com a acil-enzima para formar o segundo produto ( $R_1\text{-CO-OR}_3$ ) e a enzima livre é regenerada.

Note-se que é fundamental a estabilização dos intermediários oxianião através de ligações de hidrogénio a grupos amina de outros aminoácidos, para a função catalítica da enzima (Brady *et al.*, 1990; Bommarius e Riebel, 2004 c).

A figura 7 ilustra o mecanismo catalítico das lipases, verificando-se que as reacções de acilação e desacilação são reversíveis.



**Figura 7** - Mecanismo catalítico das lipases. (Adaptado de Muralidhar *et al.*, 2002).

### 2.3.2. Dadores de acilo e nucleófilos aceites pelas hidrolases

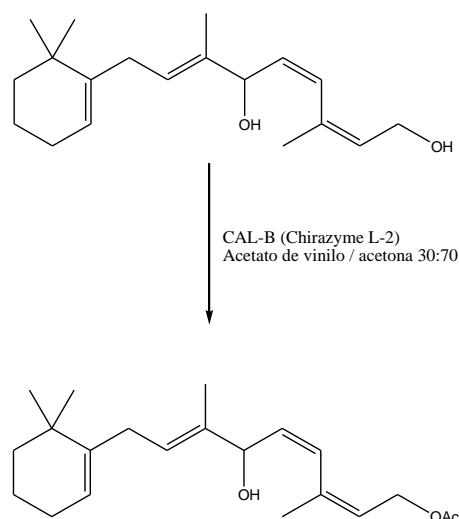
As hidrolases (Stecher e Faber, 1997; Bornscheuer e Kazlauskas, 2005; Liese *et al.*, 2006) catalisam a hidrólise e a formação de ésteres e amidas, reacções essas que são muitas vezes referidas como verdes e sustentáveis (Paravidino e Hanefeld, 2011). No entanto, apesar de ser o caso para a hidrólise, que utiliza a água como reagente/solvente, não se aplica para a síntese de ésteres e amidas, que requerem um dador de acilo adequado (Faber e Riva, 1992; Hanefeld, 2003; Chênevert *et al.*, 2006) e um solvente orgânico (Paravidino e Hanefeld, 2011). Na verdade, a formação de um éster a partir de um álcool e um de ácido (reacção de *trans*-esterificação), catalisada por uma hidrolase, é uma reacção reversível (Paravidino e Hanefeld, 2011). Contudo, este problema pode ser evitado e a reacção pode ser completa, usando dadores de acilo activados, em vez de ácidos carboxílicos (Paravidino e Hanefeld, 2011).

Existe uma diversidade de dadores de acilo, primeiros substratos aceites pelas enzimas, que catalisam uma grande variedade de reacções que envolvem hidrolases. Assim, os grupos de dadores de acilo mais comuns são os ácidos carboxílicos, os anidridos, os ésteres tri-halogenados, os ésteres de oximas, ésteres de enol e os metoxiacetatos de alquilo.

No que diz respeito aos ésteres de enol, estes são os melhores dadores de acilo activados e os mais usados numa pequena escala, tais como o acetato de vinilo, o acetato de isopropenilo e os ésteres de etoxi-vinilo (Degueil-Castaing *et al.*, 1987; Raucher e Bray, 1987; Wang *et al.*, 1988). Concretamente, o *leaving group* é um enol que tautomeriza imediatamente na forma ceto (Paravidino e Hanefeld, 2011). Deste modo, nenhum nucleófilo permanece e a reacção torna-se irreversível (Paravidino e Hanefeld, 2011). Note-se que alguns ésteres de vinilo encontram-se disponíveis comercialmente, uma vez que são blocos de construção na química de polímeros (Paravidino e Hanefeld, 2011). Estes dadores de acilo, especialmente o acetato de vinilo, são frequentemente utilizados em grande excesso, podendo ser usados como solvente da reacção (Paravidino e Hanefeld, 2011).

O acetato de vinilo surge como o dador de acilo mais reactivo e acessível economicamente, mas gera uma quantidade estequiométrica de acetaldeído (Paravidino e Hanefeld, 2011).

Um exemplo de aplicação do acetato de vinilo (figura 8) é a sua utilização na acetilação mediada pela *Chirazyme L-2* de um intermediário para a síntese de vitamina A, pela Roche (Bonrath *et al.*, 2002).



**Figura 8** - Acetilação mediada pela *Chirazyme L-2* de um intermediário para a síntese de vitamina A, pela Roche, utilizando acetato de vinilo como agente acilante. (Adaptado de Paravidino e Hanefeld, 2011).

Relativamente aos nucleófilos, as hidrolases aceitam uma diversidade de compostos, além da água (Carrea e Riva, 2000; Cais e Theil, 2002). Consequentemente, na segunda etapa da reacção catalisada por hidrolases, a acil-enzima transfere o grupo acilo para o segundo substrato, que pode ser um álcool primário, secundário (Santaniello *et al.*, 2000) ou terciário, aminas, hidrazina, entre outros, formando ésteres, hidrazidas, amidas, etc.

### 2.3.3. Selectividade das hidrolases

A capacidade das enzimas de agirem como catalisadores selectivos, numa grande variedade de reacções orgânicas, já é conhecida e foi explorada durante vários anos (Bornscheuer e Kazlauskas, 1999).

Geralmente, as hidrolases são enantioselectivas e, em alguns casos, até mesmo quase enantioespecíficas (Hanefeld, 2003). Com efeito, o grande valor das hidrolases na síntese orgânica deve-se à sua elevada enantioselectividade (Hanefeld, 2003). Em particular, as lipases são muito utilizadas em resoluções cinéticas de álcoois secundários e um modelo para a sua enantioselectividade foi estabelecido com a regra de Kazlauskas (Burgess e Jennings,

1991; Janssen *et al.*, 1991; Kazlauskas *et al.*, 1991; Xie, 1991). De facto, esta regra empírica baseia-se na observação de que numerosas lipases catalisam preferencialmente a conversão de um dos enantiómeros tanto na síntese e na reacção de hidrólise do éster (Hanefeld, 2003). Esta estereosseletividade deve-se ao arranjo espacial dos resíduos catalíticos (Cygler *et al.*, 1994; Ema *et al.*, 1998). Especificamente, no caso das aminas primárias quirais, a regra apresenta resultados fiáveis (Iglesias *et al.*, 1997). Portanto, as hidrolases, para as conversões catalíticas de qualquer enantiómero de álcoois primários e secundários quirais e de aminas primárias quirais, seguem, de um modo geral, a regra de Kazlauskas (Ema *et al.*, 2003).

É de salientar que as proteases, como a subtilisina, mostram uma selectividade previsível mas possuem enantiosselectividade oposta (Kazlauskas e Weissfloch, 1997). Contudo, a enantiosselectividade de lipases para ácidos quirais ou os seus ésteres é menos previsível (Hanefeld, 2003).

A estereoespecificidade de uma lipase depende da estrutura do substrato, da interacção no local activo e das condições de reacção, nomeadamente do solvente (Drozozowski *et al.*, 1991). As lipases têm a capacidade de reconhecer enantiómeros e grupos enantiotrópicos de moléculas proquirais (Schrag e Cygler, 1997).

Alguns modelos baseados no substrato foram desenvolvidos de modo a prever a preferência enantiomérica de lipases para um substrato quiral (Muralidhar *et al.*, 2002). Concretamente, para álcoois secundários, com a CAL-B (Orrenius *et al.*, 1995 a, b) e as lipases de *Alcaligenes* QL (Naemura *et al.*, 1996), *C. rugosa* e *P. cepacia* (Kazlauskas *et al.*, 1991), os efeitos estéricos predominam, juntamente com uma preferência de tamanho relacionado com o enantiómero (R) (Muralidhar *et al.*, 2002). Por sua vez, para álcoois primários, resolvidos pela lipase do pâncreas do porco, as características do substrato, distante do centro estérico, influenciam a estereo-seletividade, pois a quiralidade não está no grupo funcional hidroxilo e assim é diferente dos álcoois secundários (Muralidhar *et al.*, 2002).

Nos anos 80, relatou-se a acilação regioselectiva dos grupos hidroxilo primários de glicóis alifáticos simples por acção da lipase do pâncreas do porco (Cesti *et al.*, 1985). Desde então, a capacidade das hidrolases de realizar este tipo de transformação, em solventes orgânicos, foi muito explorada na modificação de outros dióis e de compostos polifuncionalizados, como por exemplo os hidratos de carbono, os esteróides e os alcalóides (Carrea e Riva, 2000).



É importante reconhecer os estudos pioneiros efectuados por Klibanov relativamente à aplicação de lipases para esterificar regioselectivamente grupos hidroxilo primários ou secundários de monossacáridos, bem como à aplicação da protease subtilisina para a modificação de glicosídeos naturais e de grupos hidroxilo primários de di- e oligossacáridos (Riva *et al.*, 1988). De facto, em diversos estudos demonstrou-se que as hidrolases podem ser aplicadas para a modificação regioselectiva de compostos polifuncionalizados naturais, especificamente de glicosídeos naturais complexos, de flavonóides, entre outros (Riva, 2002).

Por sua vez, a exploração da químio-selectividade das hidrolases foi relatada para a monoacilação de amino-álcoois e de sulfanilo-álcoois (Muralidhar *et al.*, 2002) convertendo, muitas vezes, o grupo menos reactivo quimicamente.

## **2.4. Biocatálise em meios não convencionais**

O termo meio não convencional, em biocatálise, refere-se aos sistemas com solventes diferentes da água ou a adição de componentes a sistemas aquosos com intuito de favorecer propriedades específicas do biocatalisador ou da reacção catalisada por este (Krieger *et al.*, 2004). Os meios não convencionais podem ser usados para a biocatálise quer com enzimas ou com células inteiras (Krieger *et al.*, 2004).

Durante um longo período, pensou-se que as enzimas funcionavam eficientemente apenas em soluções aquosas (García-Junceda *et al.*, 2004), visto a água ser o meio natural para a acção das enzimas (Bommarius e Riebel, 2004). Consequentemente, devido à baixa solubilidade em água de muitos compostos orgânicos, as suas utilizações na síntese orgânica são escassas, representando um obstáculo (García-Junceda *et al.*, 2004). Contudo, este tal obstáculo levou à procura de sistemas baseados na utilização de solventes orgânicos, a fim de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos (Khmelnitsky *et al.*, 1988), dando origem a três métodos. O primeiro baseia-se no uso de um co-solvente, ou seja, ao meio aquoso é adicionado um solvente miscível com água. Por sua vez, o segundo consiste em usar um sistema bifásico constituído por água e um solvente imiscível com a água. Por fim, o terceiro método baseia-se no uso de um sistema orgânico quase anidro (García-Junceda *et al.*, 2004).

É de salientar que os meios não convencionais são interessantes para as hidrolases, uma vez que baixos teores de água podem ser utilizados para favorecer as reacções de síntese

de ésteres e de proporcionar uma melhor solubilidade dos substratos pouco polares (Krieger *et al.*, 2004).

A descoberta que as enzimas podem funcionar não só em meios aquosos mas também em meios orgânicos permitiu a expansão do número de aplicações biocatalíticas (Secundo e Carrea, 2003). Assim, tornou-se possível modificar ou sintetizar inúmeros compostos de interesse nos campos farmacêutico, agroquímico e da química fina, convertendo compostos hidrofóbicos e sintetizando ésteres e amidas com elevada químio-, régio- e enantioselectividade (Secundo e Carrea, 2003).

As interacções entre a enzima e a água circundante são de extrema importância para a catálise enzimática (Kuntz e Kauzmann, 1974). Com efeito, o papel da quantidade de água no meio reacional é crucial, uma vez que esta participa directa ou indirectamente em todas as interacções não covalentes (Kauzmann, 1959; Creighton, 1983), influenciando drasticamente tanto a actividade e a estabilidade das enzimas, bem como as suas flexibilidades conformacionais (Klibanov, 1989; Halling, 1994). De igual modo, constatou-se que a concentração de água óptima para a actividade da enzima varia de solvente para solvente (Carrea *et al.*, 1995). Verificou-se que a substituição total da água por um solvente orgânico pode comprometer a função catalítica da enzima, pois, como já visto, as moléculas de água são necessárias para manter a conformação cataliticamente activa da enzima (García-Junceda *et al.*, 2004).

Para resolver esse dilema, Klibanov colocou a questão seguinte: “qual a quantidade de água necessária?” (Klibanov, 1986; Klibanov, 2001). Efectivamente, provou que preservando a camada de hidratação, necessária para a retenção da actividade catalítica da enzima, o resto da água pode ser substituído por um solvente orgânico, sem afectar a conformação activa (García-Junceda *et al.*, 2004).

É importante referir que os solventes orgânicos não são meios naturais para as enzimas, apesar de se assemelharem com o microambiente hidrofóbico presente nos organismos vivos, como por exemplo, o das membranas biológicas (Secundo e Carrea, 2002).

Geralmente, em solventes orgânicos, as enzimas apresentam uma actividade catalítica inferior do que a observada em água (Mosbach, 1976). De facto, uma causa responsável pela diminuição da actividade catalítica das enzimas provém da baixa flexibilidade estrutural da enzima em solventes não-aquosos (García-Junceda *et al.*, 2004). Assim, nestes meios, as

enzimas são muito rígidas (Chen e Arnold, 1993). Na verdade, os solventes orgânicos não possuem a capacidade de se envolverem em múltiplas ligações de hidrogénio, como acontece em meios aquosos (Kikuchi *et al.*, 1999), e também possuem constantes di-eléctricas inferiores, o que leva a interacções eletrostáticas mais fortes nas proteínas (García-Junceda *et al.*, 2004). Portanto, as alterações conformacionais da enzima são responsáveis pela sua baixa eficiência catalítica, verificada em solventes orgânicos, em comparação com aquela em soluções aquosas (Secundo e Carrea, 2002).

A polaridade do solvente orgânico pode ser uma causa para a diminuição da actividade enzimática. Com efeito, a actividade enzimática é geralmente mais elevada em solventes hidrofóbicos do que em solventes mais hidrofílicos, uma vez que os primeiros não retiram a água essencial das enzimas (Zaks e Klibanov, 1988 a; Guisán *et al.*, 1991). Desta forma, a quantidade de água adequada no meio reacional é um parâmetro crítico (Zaks e Klibanov, 1988 a), logo, para otimizar a actividade enzimática, deve-se escolher eficientemente o solvente orgânico, garantindo que a quantidade de água necessária seja mantida.

O logaritmo do coeficiente de partilha,  $\log P$ , é uma medida quantitativa da polaridade do solvente (Laane *et al.*, 1987). Como regra geral, em solventes orgânicos, a biocatálise em solventes polares é baixa com  $\log P < 2$ , é moderada em solventes com  $\log P$  compreendido entre 2 e 4, e é elevada em solventes apolares com  $\log P > 4$  (Laane *et al.*, 1987). Portanto, esta correlação entre a polaridade e a actividade enzimática corresponde à capacidade de solventes orgânicos em alterar a camada de água necessária que estabiliza a enzima (Laane *et al.*, 1987).

Também, o pH é um dos factores fundamentais para a actividade enzimática, mas não tem significado em solventes orgânicos (García-Junceda *et al.*, 2004). Adicionalmente, o estado de ionização dos grupos ionogénicos da enzima, que são retidos no estado sólido e no solvente orgânico, é também importante para a actividade da enzima (García-Junceda *et al.*, 2004).

Em suma, a redução da actividade catalítica das enzimas em solventes orgânicos pode ser atribuída a diferentes causas, tais como as limitações difusionais, as elevadas concentrações de substrato, a restrição da flexibilidade da proteína, a baixa estabilização do intermediário enzima-substrato e, até mesmo, a desnaturação parcial da enzima por liofilização, que se torna irreversível em solventes anidros, assim como a hidratação inadequada do biocatalisador (Klibanov, 1997). Contudo, ajustando os parâmetros da reacção, as actividades enzimáticas em meios orgânicos pode ser comparáveis com as obtidas em água

(Klibanov, 1997). Assim, se usadas optimamente, as enzimas são capazes de funcionar tão bem em meios orgânicos como em meios aquosos (Klibanov, 1997).

A biocatálise em meio orgânico oferece inúmeras vantagens. Efectivamente, a insolubilidade em água de muitos compostos comercialmente relevantes, as diversas reacções colaterais promovidas pela água, o equilíbrio termodinâmico prejudicial de numerosos processos em água e as dificuldades de recuperação do produto a partir de meios aquosos são razões que apoiam tal mudança (Klibanov, 1997). As enzimas, em solventes orgânicos, interagem de forma directa com o meio e a desidratação prévia das mesmas conferem-lhes novas e notáveis propriedades, incluindo uma maior estabilidade, especificidade, uma selectividade alterada que pode ser controlada pelo solvente e pela memória molecular (Zaks e Klibanov, 1984; Carrea *et al.*, 1995; Adamczak e Krishna, 2004).

De facto, as enzimas são mais termoestáveis em solventes orgânicos do que na água (Klibanov, 2001). Por exemplo, quando colocadas em solventes orgânicos, as enzimas tornam-se muito mais estáveis contra a proteólise, causa comum de inactivação em água (Zaks e Klibanov, 1988 b). Ou seja, como as enzimas e as proteases (excretadas por microrganismos contaminantes) são insolúveis nestes meios, a proteólise é suprimida (Klibanov, 2001). Por isso, o risco de contaminação microbiano é inferior em sistemas não aquosos (Krieger *et al.*, 2004). É de realçar o facto das enzimas serem insolúveis em meios orgânicos permitir a sua fácil recuperação por filtração e reutilização e eliminar a necessidade de imobilização (Zaks e Klibanov, 1985). Adicionalmente, em solventes orgânicos, as enzimas são capazes de catalisar novas reacções difíceis em água, devido a restrições cinéticas ou termodinâmicas (Zaks e Klibanov, 1985; Koskinen e Klibanov, 1996). Consequentemente, um número de conversões enzimáticas úteis e interessantes, em solventes orgânicos, foi explorado, incluindo a acilação regiosselectiva de glicóis (Cesti *et al.*, 1985) e de açúcares catalisada por lipases, entre outras (Zaks e Klibanov, 1988 b).

Além disso, a selectividade de enzimas varia com a mudança de solvente (Wescott e Klibanov, 1994; Carrea *et al.*, 1995). Esta mudança inclui variações de régio- e químiosselectividades, bem como de selectividades do substrato, enantioméricas e proquirais (Klibanov, 2001). Em meios orgânicos, as enzimas tais como as hidrolases podem catalisar esterificações e *trans*-esterificações, com altos rendimentos de produto (Carrea *et al.*, 1995). Ainda, a selectividade das enzimas, em solventes orgânicos, pode ser controlada e até mesmo invertida pelo solvente (Wescott e Klibanov, 1994). Especificamente, a enantiosselectividade das enzimas depende marcadamente do solvente (Noritomi *et al.*, 1996).

Outras vantagens dos meios orgânicos é a melhoria da solubilidade da maioria dos compostos orgânicos, aumentando a produtividade volumétrica do sistema de reacção (Zaks e Klibanov, 1985; Cabral *et al.*, 1997). O equilíbrio de uma reacção pode ser deslocado a favor do produto, que pode ser extraído na fase orgânica, facilitando assim a recuperação do biocatalisador e do produto (Zaks e Klibanov, 1985; Cabral *et al.*, 1997). Ainda, os bons rendimentos de produto que são conseguidos por redução da quantidade de substrato, e a prevenção de reacções secundárias indesejadas (Cabral *et al.*, 1997), nomeadamente a desnaturação de enzimas (Secundo e Carrea, 2003).

## 2.5. A biocatálise no âmbito da Química Verde

Como apontado por Paul Anastas "a Química Verde é uma abordagem abrangente, que é aplicável a todos os aspectos da química" (Anastas, 2002). Especificamente, a química verde, ou química sustentável, é o *design* de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam o uso e a geração de resíduos de substâncias perigosas (Bommarius e Riebel, 2004; Anastas *et al.*, 2000).

O *design* de produtos e de processos ambientalmente benignos pode ser guiado pelos Doze Princípios da Química Verde (Anastas e Warner, 1998 a; Anastas e Williamson, 1998 b). Estes Doze Princípios apontam para a melhoria da eficiência do processo e para a redução da geração de resíduos e do consumo de energia (Tao e Xu, 2009).

Deste modo, o objectivo último da Química Verde é o alcance de uma prosperidade ambiental e económica essencial, num mundo sustentável (Anastas e Kirchhoff, 2002).

Muitas vezes, a catálise é referida como um "pilar fundamental" da Química Verde (Anastas *et al.*, 2001). As reacções catalíticas (Manzer, 1994; Murahshi *et al.*, 2000) aumentam a selectividade e reduzem as exigências energéticas, pois permitem a utilização de matérias-primas renováveis ou minimizam a quantidade de reagentes necessários (Anastas e Kirchhoff, 2002; Bommarius e Riebel, 2004). Além disso, a biocatálise, na maioria dos casos, utiliza reagentes menos tóxicos (Collins *et al.*, 1998; Woodley, 2008) e, ainda, é capaz de evitar os passos de protecção, logo reduz o número total de passos numa síntese, contribuindo para o desenvolvimento de sínteses verdes (Woodley, 2008).

Outros atributos da catálise biológica são as baixas temperaturas e pressões requeridas, os reduzidos consumos de metais e de solventes orgânicos, o facto de os catalisadores biológicos serem biodegradáveis, a diminuição de resíduos gerados (Bommarius e Riebel, 2004), as reduções de custos e os cofactores utilizados não são tóxicos, produzindo resíduos inofensivos (Woodley, 2008).

Actualmente, a indústria farmacêutica tem em consideração os princípios da Química Verde. Com efeito, a biocatálise é uma tecnologia que pode ajudar a enquadrar os processos sintéticos nos objectivos da Química Verde (Woodley, 2008).

## **2.6. Síntese enzimática de derivados de compostos polifenólicos**

### **2.6.1. Os compostos polifenólicos em transformações selectivas**

Os compostos polifenólicos apresentam uma grande diversidade de actividades biológicas e farmacológicas, com discutido anteriormente na secção 1. Adicionalmente, são utilizados como substratos em transformações selectivas para melhorar as suas propriedades, podendo até apresentar novas propriedades interessantes. De facto, uma das primeiras transformações biocatalíticas reportada foi a acilação enzimática regioselectiva (Cesti *et al.*, 1985). Como uma grande parte dos produtos naturais são poli-hidroxilados, constituem substratos interessantes para este tipo de processos (Ikan, 1999). Deste modo, diversos exemplos na literatura descreveram a síntese de derivados acilados com melhores actividades biológicas, estabilidades e biodisponibilidades em relação ao composto inicial.

Repare-se que as enzimas mais utilizadas para realizar reacções de acilação são predominantemente as hidrolases (González-Sabín *et al.*, 2011).

Assim, no caso de flavonóides (compostos polifenólicos mais abundantes na Natureza), a biotransformação é implementada para modificar as suas estruturas, o que leva à alteração das suas propriedades físico-químicas e à melhoria das suas biodisponibilidades e, portanto, das propriedades biológicas dos compostos iniciais, aumentando a diversidade estrutural dos flavonóides (Wang *et al.*, 2010).

Na verdade, a maior parte dos flavonóides possui uma solubilidade e estabilidade reduzidas em meios aquosos e orgânicos (Ishihara e Nakajima, 2003; Tommasini *et al.*, 2004; Chebil *et al.*, 2007). De modo a melhorar as propriedades dos flavonóides, vários investigadores estudaram a modificação das suas estruturas por reacções químicas, enzimáticas ou químio-enzimáticas (Chebil *et al.*, 2006; Haddad *et al.*, 2006). Deste estudo, as reacções de glicosilação e de acilação receberam uma atenção especial (Chebil *et al.*, 2006). Com efeito, a primeira reacção permitiu aos flavonóides reforçar o seu carácter hidrofílico através da adição de açúcares, e, por sua vez, a segunda reacção tornou estes compostos mais hidrofóbicos por ligação de ácidos gordos (Chebil *et al.*, 2006). A acilação enzimática de flavonóides por lipases, com ácidos fenólicos, é mais regiosselectiva logo promissora comparada com a acilação química, visto que esta última pode conduzir a uma funcionalização indesejada de grupos hidroxilo fenólicos que são responsáveis pela actividade antioxidante dos flavonóides (Rice-Evans *et al.*, 1996). Por conseguinte, a acilação enzimática destes compostos pode melhorar as suas solubilidades em vários meios, as suas estabilidades (Fossen *et al.*, 1998; Ishihara e Nakajima, 2003) e, ainda, as suas actividades antioxidantes (Tamura e Yamagami, 1994).

Note-se que a modificação biocatalítica da estrutura dos flavonóides, do rendimento de conversão, do número e das proporções relativas de produtos sintetizados é dependente da natureza da enzima, do solvente e do substrato (Wang *et al.*, 2010).

Numerosos compostos glicosilados naturais são moléculas farmacologicamente importantes que possuem propriedades interessantes (Kren, 2001). Por exemplo, os flavonóis glicosilados e os seus ésteres são um importante grupo de compostos naturais activos e amplamente distribuídos no reino vegetal (Riva, 2002). Devido à presença de vários grupos reactivos tanto nas suas porções glicosídicas como nas suas porções aglicona, estes compostos são substratos delicados para a esterificação enzimática (Riva, 2002).

### **2.6.2. Aplicação de hidrolases em transformações selectivas de compostos polifenólicos**

Diversos estudos mostram que os compostos polifenólicos e os glicosídeos podem ser selectivamente acilados em grupos hidroxilo específicos, pela acção de um éster activado e na presença de uma hidrolase adequada, suspensa num solvente orgânico (Riva, 2002).

Como já discutido na secção anterior, para melhorar as propriedades biológicas e farmacológicas dos flavonóides e de outros compostos polifenólicos, a sua derivatização por glicosilação ou por acilação, aplicando métodos enzimáticos regiosselectivos tem sido explorado (Chebil *et al.*, 2007).

A CAL-B tem demonstrado ser um bom catalisador para a acilação selectiva de glicosídeos complexos que possuem grandes porções agliconas e de polissacáridos (Bertinotti *et al.*, 1994; Danieli e Riva, 1994; Danieli *et al.*, 1995) e a maioria dos estudos que tratam da acilação de flavonóides foi realizada com formas glicosiladas usando esta mesma enzima (Nakajima *et al.*, 1999; Ishihara e Nakajima, 2003; Ardhaoui *et al.*, 2004; Mellou *et al.*, 2006).

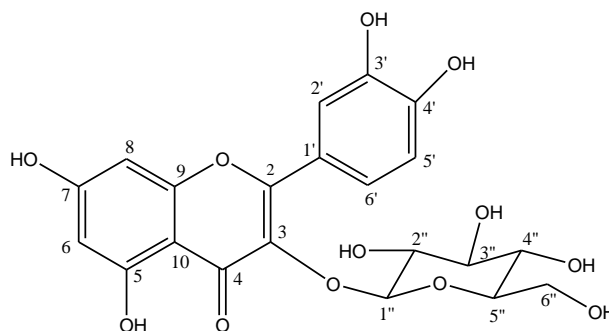
As estruturas dos flavonóides governam as suas actividades biológicas (Chebil *et al.*, 2007). Para preservar os efeitos benéficos dos flavonóides em diversas aplicações, deve-se ter cuidado com o número, as posições e os tipos de substituintes introduzidos através da reacção de acilação (Cos *et al.*, 1998; Chebil *et al.*, 2007). Na presença de um grupo glicosilo, a acilação enzimática ocorre preferencialmente no açúcar e não na aglicona.

Geralmente, as lipases e as proteases não são afectadas pela natureza da aglicona do substrato (Riva, 2002). Deste modo, os locais de acilação podem ser previstos a partir de resultados obtidos com glicosídeos semelhantes. A título de exemplo, a esterificação de unidades do  $\alpha$ -L-ramnopiranosilo catalisada pela CAL-B terá lugar no grupo hidroxilo do C-4, a acilação de um derivado  $\beta$ -D-glucopiranosilo pela acção da subtilisina ocorrerá no grupo hidroxilo primário do C-6 e, em seguida, no grupo hidroxilo C-3 (Riva, 2002).

No caso particular da isoquercitrina (figura 9), flavonóide mono-glicosilado derivado da quercetina, esta foi objecto de intensos estudos com hidrolases. Efectivamente, em 2006, Ghoul e colaboradores estudaram a acilação enzimática de flavonóides, nomeadamente da isoquercitrina, com o objectivo de avaliar a capacidade de acilação das lipases mais vulgarmente utilizadas, ou seja, a lipase B de *Candida antarctica* e a lipase de *Pseudomonas cepacia*, procedendo à sua acilação, usando um grande excesso de acetato de vinilo (Chebil *et al.*, 2006, 2007). De igual modo, um ano depois, Chebil e colaboradores utilizaram o mesmo dador de acilo, as mesmas enzimas e o mesmo flavonóide, em acetona, para investigar o efeito de diversos factores (origem da lipase, a natureza do solvente, razão molar dos



substratos e a natureza do flavonóide) sobre o desempenho e a regiosselectividade da reacção de acilação (Chebil *et al.*, 2007).



**Figura 9** - Estrutura da isoquercitrina e numeração dos respectivos carbonos.

Diversos autores incluindo Riva (Riva *et al.*, 1996), Danieli (Danieli *et al.*, 1997), Nakajima (Nakajima *et al.*, 1999), Gao (Gao *et al.*, 2001), Kontogianni (Kontogianni *et al.*, 2001, 2003) e Mellou (Mellou *et al.*, 2005), pela comparação de diferentes solventes, relataram que a maior actividade da CAL-B é alcançada na presença de acetona ou numa mistura de acetonitrilo/piridina (Chebil *et al.*, 2006).

As duas enzimas, que intervêm neste estudo, catalisaram a acetilação da isoquercitrina (Chebil *et al.*, 2007).

Nestas duas investigações, verificou-se que a lipase PS catalisou preferencialmente a acilação deste flavonóide, primeiramente, na posição C-6'' e, seguidamente, na posição C-4' e, por sua vez, a CAL-B procedeu a acilação da isoquercitrina na sua porção açúcar, nas posições C-6'', C-3'' e C-2'' e análises espectroscópicas provaram que a acetilação deste composto ocorreu apenas na parte açúcar da molécula (Chebil *et al.*, 2007; González-Sabín *et al.*, 2011).

É de salientar que, tanto com a lipase PS como com a CAL-B, foi possível isolar derivados mono- e diacilados, com bons rendimentos.

Estes resultados sugerem que a regiosselectividade da reacção depende principalmente da classe dos grupos hidroxilo disponíveis (primários, secundários e fenólicos) e das suas posições (Chebil *et al.*, 2007). Quando um grupo hidroxilo primário (da glucose) está presente, a acetilação tem lugar preferencialmente nesta posição, como acontece com a isoquercitrina (Chebil *et al.*, 2007).

De um modo geral, conclui-se que a CAL-B acila regioselectivamente uma ampla variedade de flavonóides glicosilados, embora sempre focalizada na porção açúcar (González-Sabín *et al.*, 2011). Por seu lado, a lipase PS pode operar tanto nas agliconas dos flavonóides como nas suas porções glicosídicas (González-Sabín *et al.*, 2011). Geralmente, num composto polifenólico glicosilado, os grupos hidroxilo da porção açúcar, especialmente o seu grupo hidroxilo primário, são acilados mais facilmente do que aqueles localizados na porção aglicona, (González-Sabín *et al.*, 2011).

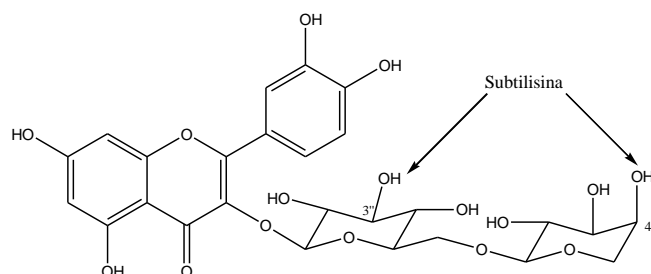
A acetilação enzimática da isoquercitrina também foi investigada em vários solventes, tais como acetonitrilo, acetona e álcool ter-amílico, usando como biocatalisador a lipase PS (Chebil *et al.*, 2007). Na acetilação enzimática deste flavonóide em acetona, acetonitrilo e álcool ter-amílico, obtiveram-se produtos mono-, di- e tri-acetatos (Chebil *et al.*, 2007). A formação do di- e tri-acetatos está associada com a depleção do mono-acetato (Chebil *et al.*, 2007). A comparação destes dados, verifica-se que a influência da natureza do solvente depende da natureza do flavonóide (Chebil *et al.*, 2007). No entanto, nenhum efeito sobre a regioselectividade da acetilação foi observado qualquer que seja o solvente utilizado (Chebil *et al.*, 2007). As percentagens dos mono-, di- e tri-acetatos resultantes diferiram com a natureza do flavonóide e do solvente (Chebil *et al.*, 2007). Contudo, para a CAL-B, vários estudos relataram que a formação de tri-éster não leva a uma diminuição do mono-éster (Arcos *et al.*, 1998 a, 1998 b).

Da mesma forma, Humeau e colaboradores realizaram um estudo metódico acerca da influência do comprimento da cadeia do dador de acilo na eficiência da *trans*-esterificação enzimática da isoquercitrina, catalisada pela CAL-B (Salem *et al.*, 2010). Embora a CAL-B seja mais activa com dadores de acilo que apresentam comprimentos de cadeias curtas a médias, a regioselectividade foi também excelente com dadores de acilo com cadeias longas (González-Sabín *et al.*, 2011). Deste estudo resultaram ésteres com melhores actividades do que a molécula parental (González-Sabín *et al.*, 2011).

Em geral, a escolha do biocatalisador depende da regioselectividade pretendida e da natureza do flavonóide, do dador de acilo e do solvente (Chebil *et al.*, 2006). Porém, a CAL-B e a lipase PS parecem ser as melhores enzimas para a síntese de ésteres de flavonóides glicosilados ou não, respectivamente (Chebil *et al.*, 2006).

Danieli e colaboradores foram os pioneiros na investigação da regioselectividade na síntese de ésteres de flavonóides (Danieli *et al.*, 1989, 1990; Danieli e Riva, 1994). Estes

investigadores mostraram que a acilação da isoquercitrina e da luteolina-7-glucósido pela protease subtilisina como biocatalisador e o butanoato de tri-fluoro-etilo como dador de acilo, origina mono- e di-ésteres na posição C-6'' e C-3'' da glucose (Danieli *et al.*, 1989). Estes resultados indicam que, quando o butanoato de tri-fluoro-etilo é utilizado, a regioselectividade não é afectada pela posição da ligação da glucose à aglicona, mas é afectada pela natureza do resíduo de açúcar (Chebil *et al.*, 2006). De facto, a mesma reacção com a quercitrina (flavonóide com uma ramnose) não ocorreu (Danieli *et al.*, 1990), pois a estrutura do dissacárido afecta a regioselectividade (Chebil *et al.*, 2006). Mostraram ainda que com a rutina, a naringina e a hesperidina, apenas os mono-ésteres foram produzidos e a ligação teve lugar na glucose, enquanto que com o peltatósido foram sintetizados mono- e di-ésteres (figura10) (Chebil *et al.*, 2006).



**Figura 10** - Locais de acilação do peltatósido pela subtilisina, originando derivados mono- e diacilados.

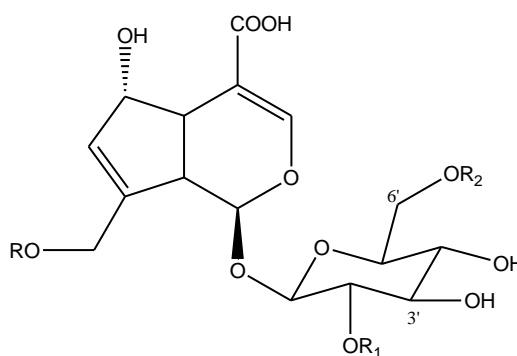
Na presença da CAL-B, Danieli e colaboradores, em 1997, indicaram que esta enzima acila a rutina nos álcoois secundários C3'' e C4'', visto que o álcool primário não se encontra disponível (Chebil *et al.*, 2006).

Recentemente, demonstrou-se que também é possível usar a CAL-B para introduzir directamente porções fenilpropenóicas nos flavonóides glicosilados (Nakajima *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2001; Kontogianni *et al.*, 2001).

A acilação de compostos polifenólicos naturais aumenta a diversidade estrutural e, de igual modo, altera as suas propriedades físicas e químicas, o que pode resultar na modificação das suas propriedades farmacológicas, tais como a biodisponibilidade e a eficácia farmacêutica (Danieli *et al.*, 1993; Oosterom *et al.*, 1996; Khmelnsky *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2002). Por conseguinte, a acilação regioselectiva de dois glicosídeos

iridóides (ácido asperulosídico acilado e desacilado) e do resveratrol, aplicando a CAL-B na presença de três dadores de acilo (acetato de vinilo, decanoato de vinilo e cinamoato de vinilo), foi investigada (Teng *et al.*, 2005).

A acilação regioselectiva dos dois glicosídeos iridóides pela CAL-B, na presença de acetato de vinilo, gerou dois derivados (Teng *et al.*, 2005). Nos dois casos, a acetilação ocorreu apenas na porção glucose sem reacção da aglicona e o grupo hidroxilo secundário no C-3' da porção glucose foi mais reactivo do que o grupo hidroxilo primário no C-6' da glucose (figura 11) (Teng *et al.*, 2005). As acilações dos dois glicosídeos iridóides catalisadas pela mesma enzima mas, agora, com decanoato de vinilo e cinamoato de vinilo foram lentas e originaram rendimentos baixos (Teng *et al.*, 2005). Por fim, esta enzima também catalisou a acetilação do resveratrol com acetato de vinilo, formando-se o resveratrol 4'-O-acetilado como único produto (Nicolosi *et al.*, 2002), enquanto que as reacções com o decanoato de vinilo e o cinamoato de vinilo foram lentas e os produtos complexos (Teng *et al.*, 2005).



ácido asperulosídico desacilado: R = R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H  
ácido asperulosídico: R = Ac, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

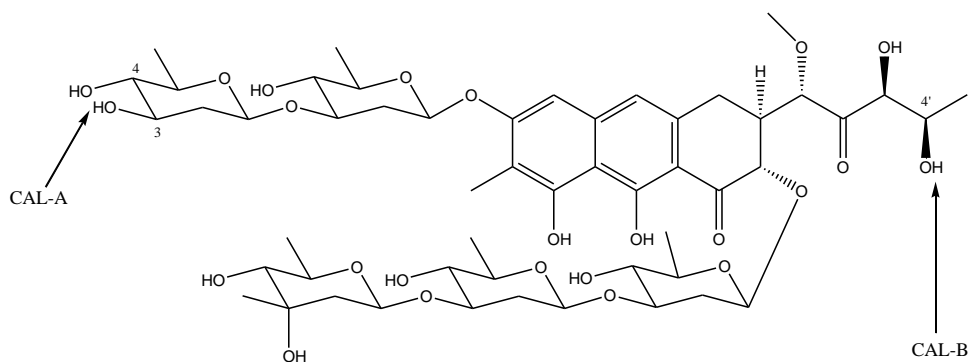
**Figura 11** – Acilação dos dois glicosídeos iridóides nas posições 3' e 6', utilizando a CAL-B como biocatalisador.

Os ácidos aureólicos (exemplo na figura 12) são policetídeos aromáticos pentaglicosídicos contendo um núcleo tri-cíclico que possuem propriedades antitumorais e outras (Lombó *et al.*, 2006; Remers, 1979; Skarbek e Speedie, 1981).

Para melhorar as suas propriedades, várias abordagens sintéticas e procedimentos biossintéticos combinatórios foram realizados para descobrir novos análogos destes ácidos aureólicos com um melhor índice terapêutico (Remsing *et al.*, 2003; Menéndez *et al.*, 2004). Assim, muitos dadores de acilo, tais como o decanoato de vinilo, o benzoato de vinilo, o crotonato de vinilo, o sorbato de vinilo, o divinilo adipato e o carbonato de di-alilo, foram testados para a acilação regioselectiva destes ácidos (González-Sabín *et al.*, 2011).

Além disso, as enzimas CAL-A (lipase A de *Candida antarctica*) e CAL-B foram muito selectivas em vários casos (González-Sabín *et al.*, 2011). Como regra geral, a CAL-B dirige preferencialmente a acilação para os grupos hidroxilo do C-4' e do C-3, enquanto que a CAL-A acila os grupos hidroxilo C-3 e C-4 (González-Sabín *et al.*, 2011). Portanto, dependendo do dador de acilo testado, pode ser possível isolar não só produtos mono-acilados, mas também di-acilados com excelentes rendimentos (González-Sabín *et al.*, 2011). É de salientar que a CAL-A catalisa apenas a *trans*-esterificação de grupos hidroxilo di-equatoriais localizados nas porções açúcar (González-Sabín *et al.*, 2011).

A avaliação *in vitro* dos derivados obtidos mostraram uma melhor actividade antitumoral do que os compostos padrão (Núñez *et al.*, 2011).



**Figura 12** - Acilação regioselectiva da mitramicina (ácido aureólico). Note-se os locais preferenciais de acilação tanto da CAL-A como da CAL-B.

### **3. Objectivos do trabalho**

A aplicação de hidrolases na modificação estrutural de compostos polifenólicos permite obter novos derivados tirando partido da elevada regiosselectividade das enzimas.

O objectivo geral do presente trabalho consiste em estudar modificações estruturais de um estilbeno glicosilado, através da biocatálise, de modo a melhorar as suas propriedades biológicas e farmacológicas.

Concretamente, com este trabalho pretende-se otimizar as condições reaccionais necessárias para a síntese enzimática de derivados acilados da polidatina, isolar e identificar os derivados obtidos e, por fim, aprofundar o conhecimento da selectividade das lipases na transformação de compostos polifenólicos glicosilados.

## II. Parte Experimental

### 1. Material e métodos

#### 1.1. Instrumentação

Todas as reacções enzimáticas realizadas foram efectuadas num agitador orbital New Brunswick Scientific, Classic Series, C24 Incubator Shaker, a 45 °C e 190 rpm.

A evaporação dos solventes foi efectuada no evaporador rotativo Büchi Switzerland, Vacuum Controller V-850.

Os pontos de fusão, *mp*, foram determinados num aparelho Büchi Melting Point B-540 mas não foram corrigidos.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protões, RMN <sup>1</sup>H, e de carbono 13, RMN <sup>13</sup>C, foram obtidos em equipamentos operando a 500 MHz e 125 MHz, respectivamente.

Os espectros de Infravermelho, IV, foram obtidos a partir de um espectrofotómetro Jasco FT/R-420.

A cromatografia em camada fina, CCF, foi efectuada em placas de alumínio de sílica gel 60 UV<sub>254</sub> Macherey-Nagel utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio/acetona/ácido acético (60:35:5) e detectada através de luz UV, a 254/366 nm (lâmpada UV Desaga Heidelberg, UVIS, a 254/366 nm). É de salientar que os cromatogramas também foram, em raros casos, imergidos numa solução de *p*-anisaldeído em metanol e ácido clorídrico, com posterior aquecimento a 100 °C, seguindo o método de Komarosky.

#### 1.2. Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente. Os solventes usados (acetona, acetato de etilo, tetra-hidrofurano, acetonitrilo, etilmetilcetona, tolueno, clorofórmio, éter de petróleo, metanol, éter dietílico) foram obtidos da Fisher Scientific e da Panreac.

O substrato polifenólico glicosilado, a polidatina, foi obtida da Aldrich.

A lipase B de *Candida antarctica* imobilizada foi adquirida da Sigma-Aldrich e a lipase de *Pseudomonas cepacia* da Aldrich.

Relativamente aos diferentes dadores de acilo, o acetato de vinilo, o cinamato de vinilo e o decanoato de vinilo foram fornecidos pela Aldrich. Por sua vez, o butirato de vinilo e o anidrido succínico foram obtidos da Fluka. Por fim, o oleato de vinilo foi preparado previamente no laboratório de Química Farmacêutica.

### **1.3. Acilação enzimática de grupos hidroxilo da polidatina**

#### **1.3.1. Definição das condições de reacção de acetilação regioselectiva da polidatina**

##### **1.3.1.1. Ensaios de *screening***

Prepararam-se doze reacções com a polidatina como substrato (composto **1**). Num grupo de seis, usou-se a CAL-B como catalisador e no segundo grupo a lipase PS. Nos dois grupos, utilizaram-se os mesmos solventes: acetona, acetonitrilo, tetra-hidrofurano, etilmetilcetona, acetato de etilo e tolueno e o dador de acilo acetato de vinilo. É de salientar que quando se aplicou o acetato de etilo como solvente, este também funcionou como dador de acilo, não tendo sido adicionado acetato de vinilo. Por conseguinte, em cada grupo de enzimas, fez-se variar os diversos solventes e os dois agentes acilantes de modo a avaliar o melhor solvente para as duas enzimas e, portanto, a melhor combinação enzima-solvente-dador de acilo. Em suma, em cada ensaio, à polidatina adicionou-se o solvente, seguido do dador de acilo e, por fim, da enzima no interior de um frasco. Seguidamente, os frascos fechados foram colocados no agitador orbital a 190 rpm e a 45 °C, e a evolução das reacções foi controlada por Cromatografia em Camada Fina (CCF).

A tabela 1 resume os ensaios de *screening* efectuados com indicação da enzima, solvente e dador de acilo empregues em cada ensaio e as respectivas quantidades adicionadas bem como os respectivos resultados, após quatro dias de reacção.



**Tabela 1** - Ensaios de *screening* das condições reaccionais para a acetilação enzimática da polidatina, usando 2 mg de substrato e 2 mg de catalisador em 0,9 mL de solvente, na presença de 0,1 mL de agente acilante.

Código da reacção	Enzima	Solvente	Agente acilante	Resultado após 96h
a	CAL-B	Acetona	Acetato de vinilo	Mistura de dois produtos
b		Acetonitrilo		
c		Tetra-hidrofurano		
d		Etilmetilcetona		
e		Acetato de etilo	Acetato de etilo	Um produto
f		Tolueno		Não houve reacção
g	Lipase PS	Acetona	Acetato de vinilo	Um produto
h		Acetonitrilo		
i		Tetra-hidrofurano		
j		Etilmetilcetona		
k		Acetato de etilo	Acetato de etilo	
l		Tolueno	Acetato de vinilo	Não houve reacção

### 1.3.2. Ensaios em maior escala

Nestes ensaios, com vista ao isolamento de derivados acilados da polidatina, utilizou-se a CAL-B ou a lipase PS como catalisadores, e a acetona como solvente. Todas as reacções foram colocadas no agitador orbital a 190 rpm e a 45°C, durante um ou vários dias, e a evolução das reacções foi controlada por Cromatografia em Camada Fina.

#### 1.3.2.1. Síntese da polidatina 6''-monoacetato

Montou-se a reacção 2, utilizando como biocatalisador a lipase PS e o acetato de vinilo como agente acilante. Note-se que o derivado pretendido era o monoacilado. Assim, num frasco adicionou-se 70 mg (0,18 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 3 mL de acetona e 0,5 mL (5,42 mmol) de acetato de vinilo e, por fim, a esta solução adicionou-se 70 mg de lipase de *Pseudomonas cepacia*. De seguida, o frasco foi fechado com uma tampa apropriada e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A reacção estava completa após vinte e um dias, verificando-se por CCF uma mistura de dois produtos,

mas uma mancha apresentava-se mais intensa que a outra. Posteriormente, procedeu-se a filtração da enzima e, após esta etapa, o solvente foi evaporado parcialmente com ajuda de um evaporador rotativo, resultando num resíduo em solução. A este último, juntou-se uma pequena quantidade de sílica gel, voltando a mistura a ser evaporada. Seguidamente, levou-se a mistura seca resultante para a coluna cromatográfica para purificar o produto, usando como eluente inicial uma mistura de uma solução destilada (clorofórmio, acetona e metanol) com acetona, na proporção de 3:1. Finda esta etapa, resultou um produto purificado, produto **2a**. Esta última apresentou-se na forma de óleo, logo, de modo a forçar a sua precipitação, adicionou-se umas gotas de éter dietílico ao produto e deixou-se evaporar a temperatura ambiente. Depois de alguns dias, o produto precipitou originando um pó branco amarelado (figura 17, rendimento 76 %).

### **Polidatina 6''-monoacetato**

**pf** 102,9-104,9 °C. **RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/ DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 2,04 (3H, s, 6''-OCOCH<sub>3</sub>); 3,48 (1H, t, 4''-H); 3,62 (1H, td, J = 7,99 Hz, 2''-H); 4,30 (1H, dd, J = 6,70 Hz, 3''-H); 4,44 (1H, d, J = 10,71 Hz, 5''-H); 4,53 (1H, s, 6''-H); 4,90 (1H, d, J = 7,00 Hz, 1''-H); 6,50 (1H, s, 4-H); 6,68 (1H, d, J = 15,88 Hz, 6-H); 6,76 (1H, s, 2-H); 6,82 (3H, m, 3'-H, 5'-H, α-H); 6,96 (1H, d, J = 16,24 Hz, β-H); 7,32 (1H, d, J = 8,44 Hz, 2'-H); 8,74 (1H, s, OH); 8,83 (1H, s, OH) ppm. **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz):** δ = 165,88 (C=O); 153,35; 153,01; 151,92; 134,42; 123,53; 123,29; 122,47; 120,28; 110,52; 102,64; 100,71; 98,34; 95,65; 68,69; 68,02; 65,00; 58,43; 48,85; 15,56 ppm. **IV (ATR):** ν<sub>máx</sub> = 833,1; 962,3; 1073,2; 1143,6; 1173,5; 1457,0; 1508,1; 1597,7; 1704,8; 3353,6 cm<sup>-1</sup>.

Nota-se que os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (de protão e de carbono) e de Infravermelho da polidatina (composto **1**) e da polidatina 6''-monoacetato (produto **2a**) encontram-se na secção apêndices (figuras 26-31).

Montou-se novamente esta reacção mas agora com a CAL-B como biocatalisador e a etilmetilcetona como solvente (reacção **3**). Note-se que as quantidades de substrato e de enzima foram modificadas. Assim, num frasco adicionou-se 50 mg (0,18 mmol) de polidatina, 3 mL de etilmetilcetona e 0,5 mL (5,42 mmol) de acetato de vinilo, e a esta solução adicionou-se 50 mg de lipase B de *Candida antarctica*. De seguida, o frasco foi fechado e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A reacção estava completa

após dois dias, verificando-se por CCF uma mistura de dois produtos, mas uma mancha apresentava-se mais intensa que a outra. É de salientar que o derivado pretendido ainda era o monoacilado e que o factor de retenção em CCF deste produto era igual ao produto em que se utilizou a lipase PS como biocatalisador e a acetona como solvente.

A tabela seguinte apresenta as reacções efectuadas em maior escala, com indicação da enzima, solvente e dador de acilo utilizados e as respectivas quantidades adicionadas em cada ensaio, durante um ou vários dias, indicando ainda os derivados pretendidos.

**Tabela 2** - Acilação regiosselectiva da polidatina com diversos dadores de acilo catalisados por CAL-B, usando acetona como solvente.

Código de reacção	Massa de polidatina (mg)	Número de equivalentes de polidatina (mmol)	Massa de CAL-B (mg)	Volume de solvente (mL)	Agente acilante	Volume de agente acilante (mL)	Número de equivalentes de agente acilante (mmol)	Derivado pretendido	Duração da reacção (dias)
4	50	0,13	50	3	Decanoato de vinilo	0,5	2,24	Monoacilado	1
5								Diacilado	6
6					Butirato de vinilo		3,94	Monoacilado	1
7								Diacilado	8
8					Cinamato de vinilo		3,07	Monoacilado	6
9								Diacilado	11
10					Anidrido succínico		7,39	Monoacilado	4
11					Oleato de vinilo		2,85	Diacilado	6
12								Monoacilado	1

### 1.3.2.2. Síntese da polidatina 6''-monodecanoato

Num frasco, adicionou-se 50 mg (0,13 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 3 mL de acetona e 0,5 mL (2,24 mmol) de decanoato de vinilo e, por fim, a esta solução adicionou-se 50 mg de lipase B de *Candida antarctica*. De seguida, o frasco foi fechado com uma tampa apropriada e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A reacção estava completa após um dia. Posteriormente, procedeu-se a filtração da enzima e, após esta etapa, o solvente foi evaporado parcialmente com ajuda de um evaporador rotativo, resultando num resíduo em solução. A este último, juntou-se uma pequena quantidade de sílica gel, voltando a mistura a ser evaporada. Seguidamente, levou-se a mistura seca resultante para a coluna cromatográfica para purificar o produto, usando como eluente inicial uma solução destilada (clorofórmio, acetona e metanol) com acetona na proporção de 10:2 até um eluente composto pelo destilado e acetona na proporção de 10:6. Finda esta etapa, resultou um produto purificado, produto **4a**. Esta última apresentou-se na forma de óleo, logo, de modo a forçar a sua precipitação, adicionou-se umas gotas de metanol e água ao produto, no balão, e deixou-se evaporar a temperatura ambiente. Depois de alguns dias de evaporação, o produto precipitou originando um pó amarelado claro (figura 18, rendimento 79 %).

#### Polidatina 6''-monodecanoato

pf 75,4-77,1 °C. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/ DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,84 (3H, t, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,20 (6H, bs, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,49 (2H, s, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,26 (2H, t, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,46 (1H, s, 4''-H); 3,62 (1H, s, 2''-H); 4,28 (1H, dd, J = 6,20 Hz, 3''-H); 4,40 (1H, d, J = 11,30 Hz, 5''-H); 4,74 (1H, s, 6''-H); 4,89 (1H, s, 6''-H); 5,03 (1H, s, 1''-H); 6,49 (1H, s, 4-H); 6,66 (1H, d, J = 9,10 Hz, 6-H); 6,73 (1H, s, 2-H); 6,79 (3H, m, 3'-H, 5'-H, α-H); 6,93 (1H, d, J = 16,41 Hz, β-H); 7,28 (1H, d, J = 8,16 Hz, 2'-H); 8,71 (1H, s, OH); 8,76 (1H, s, OH) ppm. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz): δ = 168,89 (C=O); 153,28; 152,81; 151,77; 134,56; 123,65; 123,38; 122,57; 120,24; 110,52; 102,65; 100,82; 98,33; 95,51; 71,34; 68,66; 68,01; 65,07; 58,29; 26,52; 24,07; 23,92; 23,71; 19,47; 17,32; 8,83 ppm. IV (ATR): ν<sub>máx</sub> = 671,1; 825,4; 1081,9; 1181,2; 1234,2; 1508,1; 1592,9; 1716,3; 3311,2 cm<sup>-1</sup>.

Montou-se a reacção **5** com um procedimento igual ao da reacção **4**, no âmbito de obter um derivado diacilado. A evolução da reacção foi controlada por CCF e ao fim de seis dias, obteve-se uma mistura de dois produtos, difíceis de separar.

### 1.3.2.3. Síntese da polidatina 6''-monobutirato

Num frasco, adicionou-se 50 mg (0,13 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 3 mL de acetona e 0,5 mL (3,94 mmol) de butirato de vinilo e, por fim, a esta solução adicionou-se 50 mg de lipase B de *Candida antarctica*. De seguida, o frasco foi fechado com uma tampa apropriada e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A reacção estava completa após um dia. Posteriormente, procedeu-se a filtração da enzima e, após esta etapa, o solvente foi evaporado parcialmente com ajuda de um evaporador rotativo, resultando num resíduo em solução. A este último, colocou-se uma pequena quantidade de sílica gel, voltando a mistura a ser evaporada. A este último, juntou-se uma pequena quantidade de sílica gel, voltando a mistura a ser evaporada. Seguidamente, levou-se a mistura seca resultante para a coluna cromatográfica para purificar o produto, usando como eluente inicial clorofórmio, acetona e ácido acético na proporção de 60:10:1 até 12:5:1. É de salientar que o produto purificado foi dificilmente evaporado uma vez que a solução purificada tinha ácido acético, este possui um ponto de ebulição superior a 100 °C, resultando num produto em solução. Para resolver esse problema, procedeu-se a uma decantação e, assim, após alguns dias a evaporar a temperatura ambiente, originou-se o produto **6a**. Esta última apresentou-se na forma de um sólido branco amarelado (figura 19, rendimento 56 %).

#### Polidatina 6''-monobutirato

**pf** 184,2-185,1°C. **RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/ DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ = 0,77 (3H, dd, J = 7,24 Hz, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,49 (2H, dq, J = 7,32 Hz, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,20 (2H, t, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,52 (1H, m, 4''-H); 4,18 (1H, dd, J = 7,05 Hz, 2''-H); 4,38 (1H, d, J = 11,66 Hz, 3''-H); 4,67 (2H, s, 5''-H, 6''-H); 4,83 (1H, d, J = 4,60 Hz, 1''-H); 6,41 (1H, s, 4-H); 6,60 (2H, d, J = 12,29 Hz, 6-H, 2-H); 6,69 (2H, s, 3'-H, 5'-H); 6,75 (1H, d, J = 8,62 Hz, α-H); 6,88 (1H, d, J = 16,67 Hz, β-H); 7,24 (1H, d, J = 8,18 Hz, 2'-H); 8,81 (1H, s, OH); 8,91 (1H, s, OH) ppm. **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)**: δ = 173,10 (C=O); 158,21; 157,88; 156,78; 139,14; 128,28; 127,98; 127,26; 125,05; 115,30; 107,24; 105,29; 103,14; 100,38; 76,44; 73,60; 72,81; 69,87; 63,14; 35,40; 17,75; 13,05 ppm. **IV (ATR)**: ν<sub>máx</sub> = 839,8; 1072,2; 1171,5; 1453,1; 1513,9; 1591,0; 1716,3; 2915,8; 3353,6 cm<sup>-1</sup>.

#### 1.3.2.4. Síntese da polidatina 2'',6''-dibutirato

Num frasco, adicionou-se 50 mg (0,13 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 3 mL de acetona e 0,5 mL (3,94 mmol) de butirato de vinilo e, por fim, a esta solução adicionou-se 50 mg de lipase B de *Candida antarctica*. De seguida, o frasco foi fechado com uma tampa apropriada e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A reacção estava completa após oito dias. Posteriormente, procedeu-se a filtração da enzima e, após esta etapa, o solvente foi evaporado parcialmente com ajuda de um evaporador rotativo, resultando num resíduo em solução. A este último, juntou-se uma pequena quantidade de sílica gel, voltando a mistura a ser evaporada. Seguidamente, levou-se a mistura seca resultante para a coluna cromatográfica para purificar o produto, usando como eluente inicial uma mistura de destilado (clorofórmio, acetona e metanol) com acetona, na proporção de 5:1 até 2:1. Finda esta etapa, resultou um produto purificado, obtendo-se o produto **7a**. Esta última apresentou-se na forma de óleo, logo, de modo a forçar a sua precipitação, adicionou-se umas gotas de éter dietílico ao produto e deixou-se evaporar a temperatura ambiente. Depois de alguns dias, o produto permaneceu na forma de um óleo amarelado (figura 20, rendimento 28 %).

#### Polidatina 2'',6''-dibutirato

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/ DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0,82 (6H, m, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,54 (4H, ddq, J = 7,49 Hz, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,25 (4H, m, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,30 (2H, t, J = 12,26 Hz, 6''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,63 (1H, m, 4''-H); 4,15 (1H, dd, J = 6,81 Hz, 2''-H); 4,34 (1H, d, J = 10,19 Hz, 3''-H); 4,86 (1H, d, J = 7,75 Hz, 5''-H); 4,96 (1H, t, 6''-H); 5,08 (1H, d, J = 6,90 Hz, 6''-H); 5,14 (1H, d, J = 5,53 Hz, 1''-H); 6,36 (1H, t, 4-H); 6,57 (1H, d, J = 7,52 Hz, 6-H); 6,67 (1H, s, 2-H); 6,72 (2H, m, 3'-H, 5'-H); 6,84 (1H, s,  $\alpha$ -H); 6,89 (1H, s,  $\beta$ -H); 7,24 (1H, d, J = 8,61 Hz, 2'-H); 9,00 (1H, s, OH); 9,08 (1H, s, OH) ppm. **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz):**  $\delta$  = 172,76 (C=O); 172,72 (C=O); 158,15; 158,02; 156,92; 139,03; 128,22; 127,75; 127,24; 124,91; 115,25; 107,10; 105,14; 103,09; 100,48; 76,74; 73,62; 71,14; 68,20; 62,87; 35,72; 35,29; 29,01; 17,85; 17,68; 13,63; 13,17; 13,05 ppm. **IV (ATR):**  $\nu_{\text{máx}}$  = 681,7; 756,0; 840,8; 963,3; 1079,0; 1172,5; 1264,1; 1455,0; 1514,8; 1604,5; 1718,2; 3418,2 cm<sup>-1</sup>.

Nota-se que os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (de protão e de carbono) e de Infravermelho da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto **7a**) encontram-se na secção apêndices (figuras 32-34).

### 1.3.2.5. Síntese da polidatina 6''-monooleato

Num frasco, adicionou-se 100 mg (0,26 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 6 mL de acetona e 1 mL (2,85 mmol) de oleato de vinilo e, por fim, a esta solução adicionou-se 100 mg de lipase B de *Candida antarctica*. De seguida, o frasco foi fechado com uma tampa apropriada e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A reacção estava completa após um dia. Posteriormente, procedeu-se a filtração da enzima e, após esta etapa, o solvente foi evaporado parcialmente com ajuda de um evaporador rotativo, resultando num resíduo em solução. A este último, colocou-se uma pequena quantidade de sílica gel, voltando a mistura a ser evaporada. Seguidamente, levou-se a mistura seca resultante para a coluna cromatográfica para purificar o produto, usando como eluente inicial uma mistura de éter de petróleo com clorofórmio, na proporção de 1:1 até um eluente composto por clorofórmio e acetona, na proporção de 10:3. Finda esta etapa, resultou um produto purificado, produto **12a**. Esta última apresentou-se na forma de um óleo castanho amarelado (figura 21, rendimento 79 %).

#### Polidatina 6''-monooleato

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/ DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0,87 (3H, s, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,21 (24H, bs, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,48 (2H, s, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,97 (2H, s, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,16 (1H, s, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,25 (1H, s, 6''-OCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,49 (1H, s, 4''-H); 3,65 (1H, s, 2''-H); 4,28 (1H, s, 3''-H); 4,40 (1H, s, 5''-H); 4,88 (1H, s, 6''-H); 5,31 (1H, s, 1''-H); 6,50 (1H, s, 4-H); 6,73 (4H, s, 6-H, 2-H, 3'-H, 5'-H); 6,90 (2H, d, J = 14,66 Hz, α-H, β-H); 7,30 (1H, m, 2'-H) ppm. **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz):** δ = 174,28 (C=O); 158,49; 157,86; 156,83; 139,92; 130,25; 129,81; 129,01; 128,77; 127,92; 125,51; 115,81; 107,97; 106,33; 103,58; 100,69; 76,87; 73,84; 73,28; 70,36; 63,55; 33,98; 31,83; 31,71; 29,70; 29,67; 29,46; 29,24; 29,17; 29,11; 29,04; 28,99; 28,90; 27,16; 24,74; 22,61; 14,09 ppm. **IV (ATR):** ν<sub>máx</sub> = 681,7; 758,9; 839,8; 963,3; 1077,1; 1173,5; 1264,1; 1457,0; 1514,8; 1604,5; 1716,3; 3390,2 cm<sup>-1</sup>.

Com a finalidade de obter um derivado diacilado, montou-se a reacção **11** com um procedimento semelhante ao da reacção **12**, alterando-se apenas as quantidades de substrato,



de enzima e de agente acilante para metade. A evolução da reacção foi controlada por CCF e ao fim de seis dias, obteve-se uma mistura de produtos, difíceis de separar.

Montaram-se duas reacções (**8** e **9**), com o cinamato de vinilo como agente acilante e CAL-B como catalisador, de modo a obter derivados monoacilados e diacilados, respectivamente. Destaca-se que ambas as reacções seguiram o mesmo procedimento, alterando-se apenas o tempo de reacção com vista a obtenção dos derivados desejados. Deste modo, em cada frasco adicionou-se 50 mg (0,18 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 3 mL de acetona e 0,5 mL (3,07 mmol) de cinamato de vinilo e, por fim, a esta solução adicionou-se 50 mg de CAL-B. De seguida, os frascos foram fechados com uma tampa apropriada e foram colocados no agitador orbital para as reacções serem agitadas a 190 rpm, a 45 °C. A evolução das duas reacções foi controlada por CCF e ao fim de vários dias de reacção (seis e onze dias, respectivamente), para ambas as reacções obteve-se uma mistura de produtos, difíceis de separar.

Montou-se a reacção **10**, com o anidrido succínico como agente acilante e a CAL-B como catalisador, de modo a obter um derivado monoacilado. Num frasco adicionou-se 50 mg (0,13 mmol) de polidatina, a esta juntou-se 3 mL de acetona e 0,5 mL (7,39 mmol) de anidrido succínico e, por fim, a esta solução adicionou-se 50 mg de CAL-B. De seguida, o frasco foi fechado com uma tampa apropriada e foi colocado no agitador orbital para a reacção ser agitada a 190 rpm, a 45 °C. A evolução da reacção foi controlada por CCF e ao fim de quatro dias não tinha ocorrido reacção.

A tabela 3 resume as massas iniciais de substrato utilizadas em cada reacção e as massas finais de produto obtidas, com o respectivo rendimento de cada reacção e, quando possível, o ponto de fusão de cada produto.

**Tabela 3** - Massas iniciais de substrato utilizadas e massas finais de produto obtidas em cada reacção, em maior escala, com o respectivo rendimento e o ponto de fusão de cada reacção.

Código de reacção	Massa inicial de polidatina (mg)	Massa final de produto (mg)	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
<b>2</b>	70	62,1	76	102,9-104,9
<b>4</b>		62,1	79	75,4-77,1
<b>6</b>	50	33,3	56	184,2-185,1
<b>7</b>		19,0	28	*
<b>12</b>	100	132,5	79	*

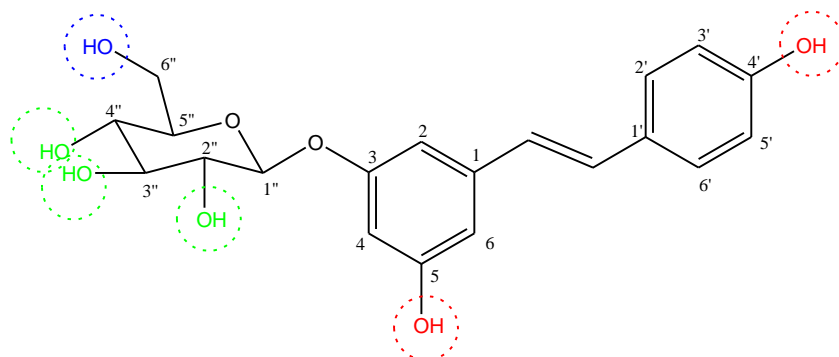
\*O produto obtido foi um óleo.

## 2. Resultados e discussão

### 2.1. Definição das condições de reacção de acetilação regioselectiva da polidatina

A necessidade de processos químicos ambientalmente mais aceitáveis tornou a biocatálise mais atractiva de um ponto de vista ambiental e económico, bem como a crescente importância das transformações selectivas de compostos polifenólicos justificam este trabalho. Assim, utilizou-se métodos enzimáticos em vez de métodos químicos clássicos (não suficientemente regioselectivos) para a derivatização da polidatina (composto polihidroxiado), por ser uma estratégia vantajosa para obter derivados mono- e/ou difuncionalizados.

Numa fase inicial do trabalho, efectuaram-se ensaios de *screening* em pequena escala, de modo a determinar quais as características, nomeadamente a enzima e o solvente, mais adequadas para a reacção com a polidatina (figura 13), o substrato em estudo. Com efeito, nestes ensaios combinou-se cada enzima com determinados solventes e/ou agentes acilantes, ou só com solventes (no caso do solvente também funcionar como agente acilante, na reacção), de maneira a obter a melhor combinação enzima-solvente-dador de acilo possível. Por conseguinte, um resultado positivo significa que a combinação entre a enzima, o solvente e o agente acilante é eficaz mas, pelo contrário, um resultado negativo implica uma combinação ineficaz destas três características. Contudo, atenta-se em que certos parâmetros podem influenciar a actividade enzimática, tais como a água e o pH.



**Figura 13** – Estrutura da polidatina, com a numeração dos respectivos carbonos. Destaca-se o grupo hidroxilo primário (azul), os grupos hidroxilo secundários (verde) e os grupos hidroxilo fenólicos (vermelho).

### 2.1.1. Rastreo de enzimas e de solventes

Neste trabalho, utilizaram-se duas enzimas, em particular a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) e a lipase de *Pseudomonas cepacia* (lipase PS). A escolha destas duas lipases deve-se não só ao facto de terem sido largamente utilizadas em inúmeros estudos relacionados com acilações enzimáticas regioselectivas de compostos polifenólicos, nos últimos anos, mas também devido às vantagens que estas hidrolases apresentam, especificamente são acessíveis comercialmente, estáveis, versáteis e não necessitam de cofactores, entre outras anteriormente referidas.

Deste modo, avaliou-se a capacidade destas duas lipases comerciais para acilar regioselectivamente a polidatina, utilizando vários solventes e um dador de acilo, apresentados na tabela 4. Posteriormente, de modo a controlar o desenvolver das reacções em questão, procedeu-se a identificação por Cromatografia em Camada Fina das lipases com capacidade de realizar a acilação (mono- ou diacilação) do substrato em estudo, consoante os seis solventes e o dador de acilo testado.

Portanto, realizaram-se ensaios de *screening*, variando o solvente e o dador de acilo, aplicando cada uma das duas enzimas, acima mencionadas, e a polidatina, como substrato.

Nestes ensaios, testou-se um dador de acilo, o acetato de vinilo. Este é reactivo, usado em pequena escala, disponível comercialmente e muitas vezes utilizado em grande excesso. Contudo, note-se que, nestes ensaios de *screening*, o acetato de etilo funcionou tanto como solvente e dador de acilo, formando o conjunto enzima-actetato de etilo.

Relativamente aos solventes utilizados, a polidatina é pouco solúvel no tolueno mas é solúvel nos cinco solventes restantes, isto é, a acetona, o acetonitrilo, o tetra-hidrofurano, a etilmetilcetona e o acetato de etilo. A escolha destes seis solventes baseia-se em estudos acerca dos solventes mais adequados para as enzimas mais commumente usadas em biocatálise, tais como os estudos de Riva e colaboradores (1996), Danieli e colaboradores (1997), Kontogianni e colaboradores (2003), Mellou e colaboradores (2005) e Chebil e colaboradores (2007). O uso de meios orgânicos, neste trabalho, justifica-se pela necessidade de proteger os diferentes grupos hidroxilo do açúcar e pela baixa solubilidade do substrato em análise em água. Com efeito, a polidatina possui vários grupos hidroxilo que dificultam a sua solubilidade na água.

Na tabela 4, encontra-se indicado a enzima, o solvente e o dador de acilo utilizados em cada ensaio de *screening* e os respectivos resultados, após quatro dias.

**Tabela 4** - Ensaio de *screening* com indicação da enzima, solvente e dador de acilo utilizados em cada ensaio e os respectivos resultados, após 96h.

Enzima	Código da reacção	Solvente	Dador de acilo	Resultados após 96h	
CAL-B	a	Acetona	Acetato de vinilo	Mistura de dois produtos	
	b	Acetonitrilo			
	c	Tetrahidrofurano			
	d	Etilmetilcetona			
	e	Acetato de etilo	Acetato de etilo	Um produto	
	f	Tolueno	Acetato de vinilo	Não houve reacção	
Lipase PS	g	Acetona		Acetato de vinilo	Um produto
	h	Acetonitrilo			
	i	Tetrahidrofurano			
	j	Etilmetilcetona			
	k	Acetato de etilo		Acetato de etilo	
	l	Tolueno	Acetato de vinilo	Não houve reacção	

Da observação da tabela anterior e dos cromatogramas destes ensaios, note-se que ambas as lipases testadas foram aceites pelo substrato, a polidatina.

Verifica-se que ambas as lipases, a CAL-B e a lipase PS, foram capazes de acilar a polidatina nos diferentes solventes, excepto no tolueno, pois não houve reacção.

Além disso, da análise dos cromatogramas destes ensaios, afere-se o aparecimento de diversas manchas, que podem corresponder ou ao composto inicial (a própria polidatina) ou aos derivados mono- ou diacilados. De acordo com a posição destas manchas e das suas distâncias percorridas na placa cromatográfica, sugere-se que: nos ensaios de **a** até **d**, obteve-se uma mistura de derivados mono- e diacilados; nos ensaios **e** e de **g** até **k**, obteve-se unicamente derivados monoacilados; e, finalmente, nos ensaios **f** e **l**, não houve reacção.

Com a CAL-B e a lipase PS, as acilações enzimáticas foram, na maioria das vezes, regioselectivas, formando-se um produto. No entanto, visto que, em certos ensaios com a CAL-B, se obteve uma mistura de dois produtos, pode-se afirmar que esta enzima não mostrou uma regioselectividade total.

De facto, nos ensaios **a**, **b**, **c** e **d**, verificou-se que a combinação do acetato de vinilo, como dador de acilo, com a CAL-B resultou na formação de uma mistura de dois produtos. Possivelmente, a acilação ocorreu apenas na porção glicosídica, ou seja, pode traduzir-se na acilação de um grupo hidroxilo, no caso do derivado monoacilado, e de dois grupos hidroxilo, no caso do derivado diacilado, uma vez que o álcool primário da glucose é o local preferencial de acilação em compostos glicosilados. Porém, ainda no caso do derivado diacilado, existe a eventualidade da acilação do segundo grupo hidroxilo se ter dirigido na porção aglicona. Por conseguinte, com base em estudos enzimáticos em compostos polifenólicos glicosilados, o derivado monoacilado corresponderá ao derivado 6''-monoacetato da polidatina e, por sua vez, o derivado diacilado corresponderá ao derivado 6'', x-diacetato da polidatina, não se sabendo a posição exacta do segundo grupo hidroxilo acilado. No entanto, de acordo com estudos efectuados em outros compostos polifenólicos glicosilados, a posição do segundo grupo hidroxilo acilado ocorrerá eventualmente no C-3'' da porção glicosídica ou no C-4 da aglicona da polidatina. Como previamente referido, nestes ensaios, a regiosselectividade não foi muito satisfatória, visto se ter obtido uma mistura de dois produtos. Mas, pela análise dos cromatogramas, constata-se uma diferença de intensidade das manchas, sendo a mancha do derivado monoacilado ligeiramente mais intensa do que aquela do derivado diacilado, concluindo-se que este primeiro se encontra em maior quantidade.

Em relação ao ensaio **f** e **l**, o solvente utilizado (tolueno) com o acetato de vinilo originou uma combinação ineficaz, para ambas as lipases, uma vez que não ocorreu reacção, após 96h, concluindo-se que o tolueno é um solvente inadequado para estas enzimas e para a polidatina.

Por fim, relativamente aos ensaios **g**, **h**, **i**, **j** e **k**, com os diferentes solventes testados, dadores de acilo e a lipase PS, resultou um produto (possivelmente derivado monoacilado). Esta enzima revela, portanto, uma elevada regiosselectividade. Deste modo, a acilação enzimática é prevista no grupo hidroxilo primário da glucose, formando derivados 6'-monoacetatos da polidatina.

Por conseguinte, observou-se que estas duas hidrolases poderão ter uma preferência para o hidroxilo primário, C-6, da glucose, com base em estudos prévios. Efectivamente, posteriormente, a partir da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e

de Infravermelho dos derivados sintetizados, em reacções de maior escala, esta observação será confirmada.

Além disso, averiguou-se que não só estas lipases são biocatalisadores apropriados para a polidatina, bem como que a reacção de acilação enzimática é mais rápida utilizando a CAL-B como biocatalisador do que a lipase PS.

Adicionalmente, da análise dos cromatogramas, verificou-se que a acetona, o acetato de etilo e o etilmetilcetona são os melhores solventes para a lipase B de *Candida antarctica*. No entanto, esta lipase possui uma maior actividade em acetona, como confirmado por vários investigadores (Riva *et al.*, 1996; Mellou *et al.*, 2005). Por sua vez, o solvente mais adequado para a lipase de *Pseudomonas cepacia* é também a acetona.

## 2.2. Reacções em maior escala

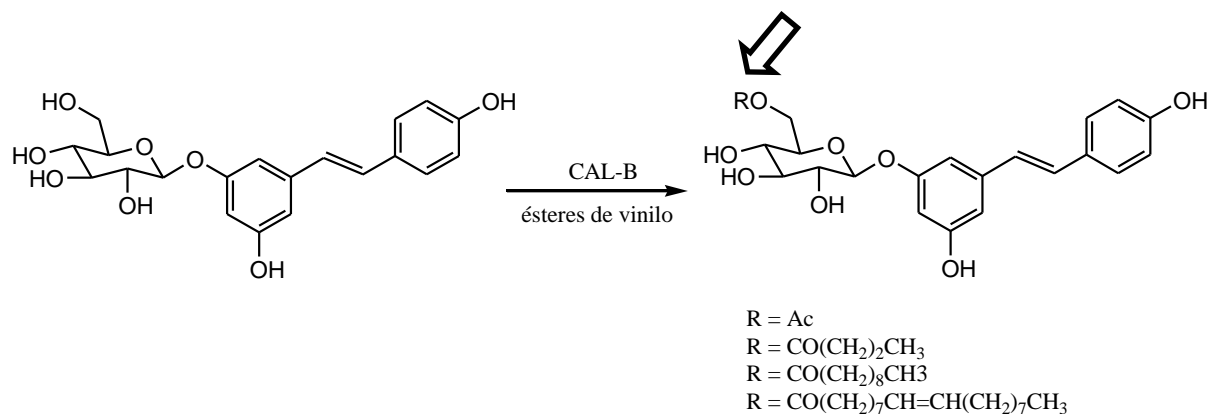
### 2.2.1. Síntese enzimática e isolamento dos derivados mono- e diacilados da polidatina

A lipase B de *Candida antarctica* foi selecionada para a maioria das reacções em maior escala, em detrimento da lipase de *Pseudomonas cepacia*, visto as reacções com esta enzima serem mais rápidas e, igualmente, se obter os derivados pretendidos, de acordo com a análise dos cromatogramas realizados nos ensaios de *screening*. Contudo, é de referir que a maioria das reacções catalisadas pela CAL-B dá origem a uma mistura de dois produtos, examinando os cromatogramas das reacções catalisadas por esta hidrolase. Deste modo, com o controlo do tempo de reacção, foi possível evidenciar um dos dois derivados em relação ao outro, consoante o derivado desejado. É de notar que, nestas reacções em maior escala, exploraram-se outras condições de acilação. Na verdade, utilizaram-se variados agentes acilantes (quase todos ésteres de vinilo) além do acetato de vinilo e do acetato de etilo, tais como o decanoato de vinilo, o butirato de vinilo, o oleato de vinilo, o cinamato de vinilo e o anidrido succínico.

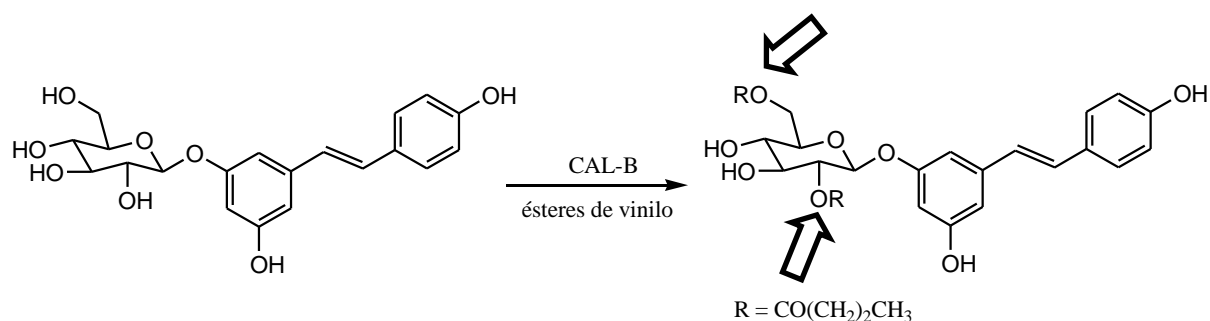
A identificação dos derivados pretendidos, obtida das reacções em maior escala, foi efectuada por análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$ , bem como por análise dos espectros de Infravermelho, IV, e, ainda, por comparação com os dados da literatura existente.

É importante salientar que, neste presente trabalho, não se efectuou um estudo exacto do efeito da razão molar do dador de acilo para o substrato, possuindo este certos efeitos na reacção enzimática, por exemplo no rendimento de conversão da reacção. Assim, as proporções utilizadas, neste trabalho, basearam-se em proporções aplicadas em diversos estudos neste tema.

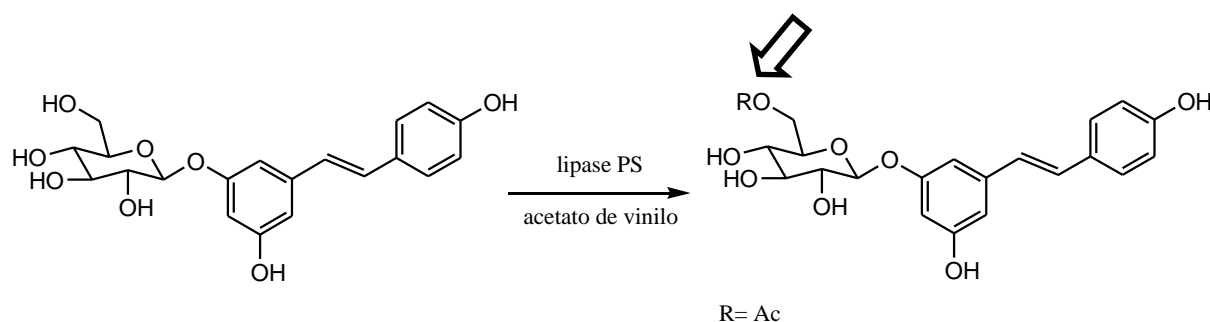
As figuras 14, 15 e 16 ilustram as reacções gerais que foram realizadas ao longo deste trabalho, por um lado, com a CAL-B permitindo o isolamento de monoésteres, na maioria das vezes, e de diésteres com bons rendimentos e, por outro lado, com a lipase PS permitindo o isolamento de monoésteres, igualmente, com bons rendimentos.



**Figura 14** - Reacção de monoacilação regioselectiva da polidatina, aplicando a CAL-B como biocatalisador.



**Figura 15** - Reacção de diacilação regioselectiva da polidatina, aplicando a CAL-B como biocatalisador.



**Figura 16** - Reacção de monoacilação regioselectiva da polidatina, aplicando a lipase PS como biocatalisador.

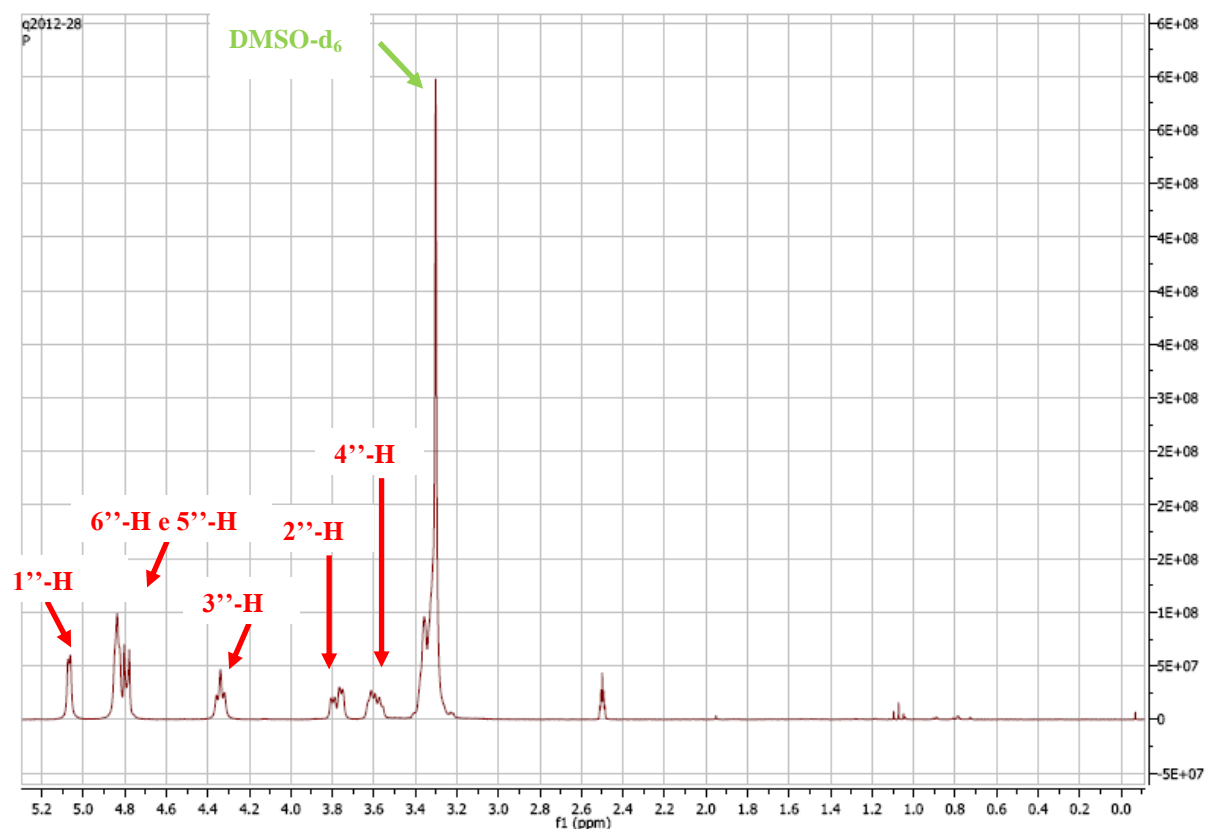
Analisando as três figuras anteriores, confirma-se que a acilação da polidatina ocorre preferencialmente e, em primeiro lugar, no grupo hidroxilo primário da glucose, na posição C-6', tanto com a CAL-B como com a lipase PS, como descrito na literatura. Seguidamente,



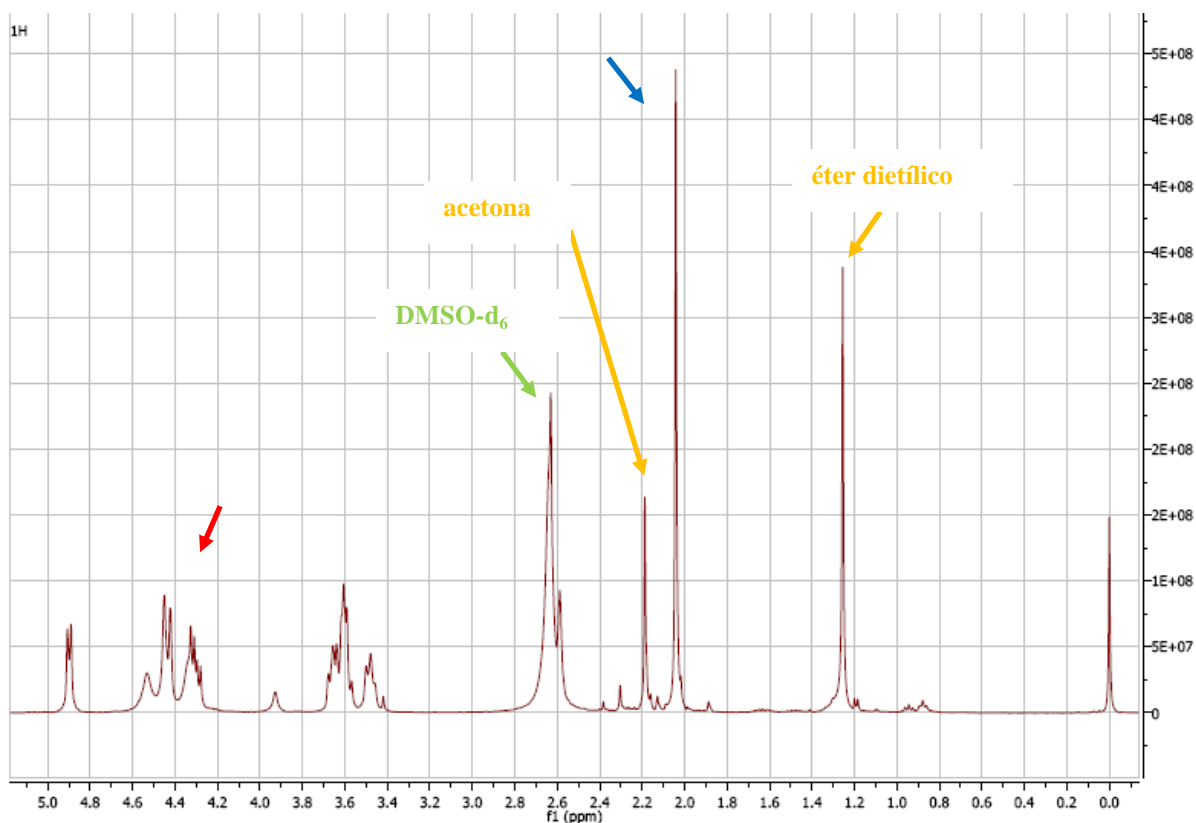
a acilação da polidatina ocorre na posição C-2'' da glucose, originando um derivado diacilado da polidatina (como mostra a figura 15). Com efeito, este facto também acontece com a isoquercitrina, um flavonóide glicosilado, referida previamente, em que a acilação primeiramente ocorre no álcool primário da glucose e, de seguida, nas posições C-3'' e C-2'' da sua porção glicosídica.

### 2.2.1.1. Síntese da polidatina 6''-monoacetato

As figuras 17 e 18 ilustram uma zona (da porção glicosídica) dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão da polidatina (com indicação da posição dos protões), do produto **2a**.



**Figura 17** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina com indicação da posição dos protões da porção glicosídica.



**Figura 18** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto **2a** com indicação do desvio causado pela acilação da polidatina e com indicação dos solventes e dos prótons do grupo acilo.

Ao comparar o espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina com o espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto **2a** é possível verificar um desvio dos prótons 6'' e 3'' (indicado a vermelho). Deste modo, pode-se afirmar que este derivado da polidatina (produto **2a**) foi acilado na posição 6'' ou na posição 3''. Contudo, a literatura exprime que a lipase PS (bem como a CAL-B) acila preferencialmente o grupo hidroxilo primário da glucose. Por conseguinte, conclui-se que o derivado formado é a polidatina 6''-monoacetato.

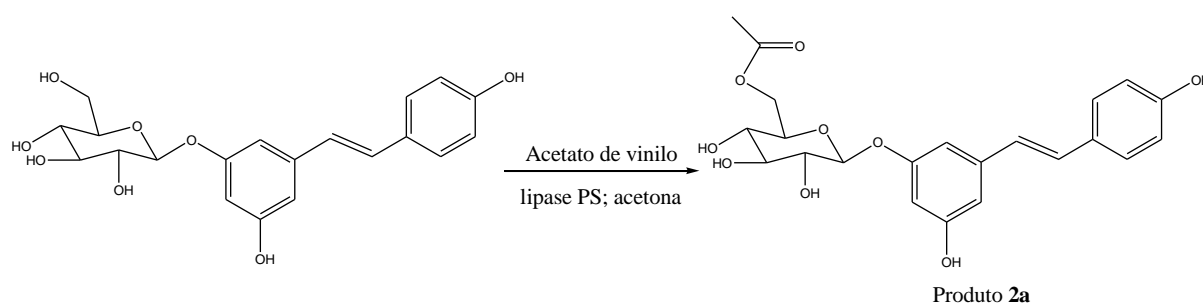
O pico assinalado a verde corresponde ao solvente DMSO- $\text{d}_6$ , o pico assinalado a azul corresponde aos prótons do produto acilado ( $\text{CH}_3$ ) e, por fim, os picos assinalados a cor-de-laranja são, possivelmente, o éter dietílico (éter dietílico em  $\text{CDCl}_3$  (t) com desvio químico igual a 1,21 ppm, para RMN  $^1\text{H}$ ) e a acetona (acetona em  $\text{CDCl}_3$  (s) com desvio químico igual a 2,17 ppm, para RMN  $^1\text{H}$ ) pelos valores do desvio químico destes dois picos, indicando que o produto não estava totalmente seco quando foi analisado.

É de salientar que os picos destes solventes também são visíveis no espectro RMN  $^{13}\text{C}$  deste produto.

A partir da análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$  deste produto (figura 30), verifica-se a presença de um único grupo carbonilo, apontando que o produto é monoacilado. De igual modo, a partir do espectro de IV do produto **2a** (figura 31), note-se a presença do grupo carbonilo.

É de referir que a análise dos restantes produtos (**5a**, **6a** e **12a**) seguiu uma interpretação semelhante à do produto **2a**.

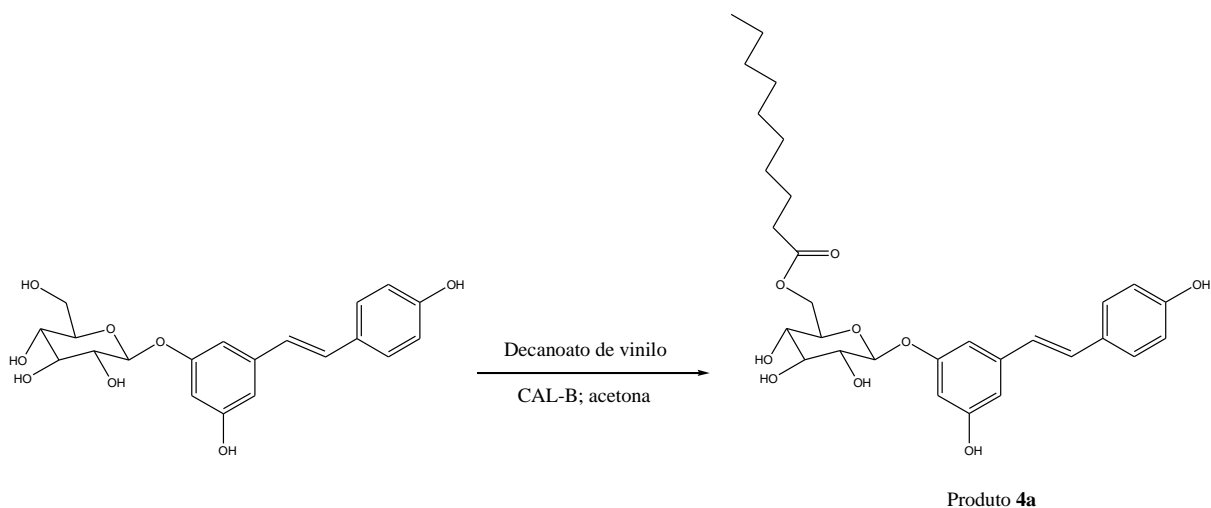
Na reacção **2**, a lipase PS catalisou a acilação da polidatina no álcool primário da glucose, aplicando do acetato de vinilo como agente acilante, originando-se a polidatina 6''-monoacetato.



**Figura 19** - Reacção de acilação regiosselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monoacetato (produto **2a**), aplicando a lipase PS como biocatalisador e o acetato de vinilo como agente acilante.

#### 2.2.1.2. Síntese da polidatina 6''-monodecanoato

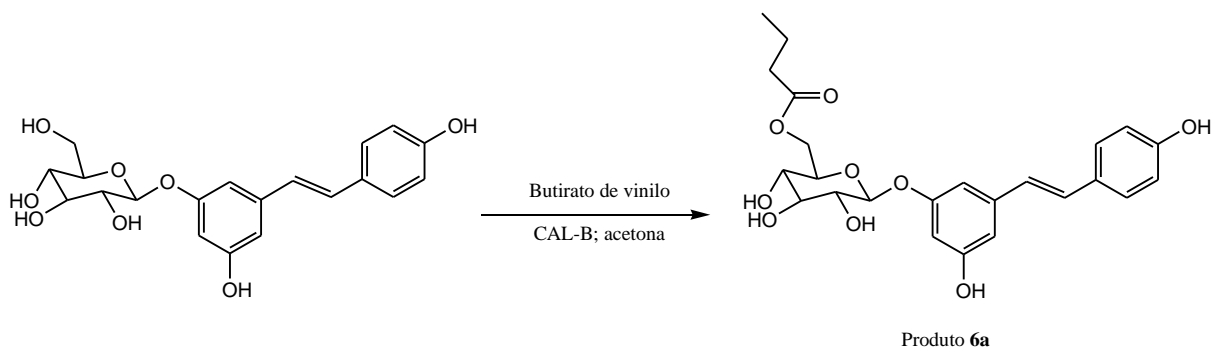
No que respeita a reacção **4**, aplicou-se o decanoato de vinilo como agente acilante e a CAL-B como biocatalisador. Esta última acilou preferencialmente o grupo hidroxilo primário da glucose da polidatina, dando origem a polidatina 6''-monodecanoato.



**Figura 20** - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monodecanoato (produto **4a**), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o decanoato de vinilo como dador de acilo.

### 2.2.1.3. Síntese da polidatina 6''-monobutirato

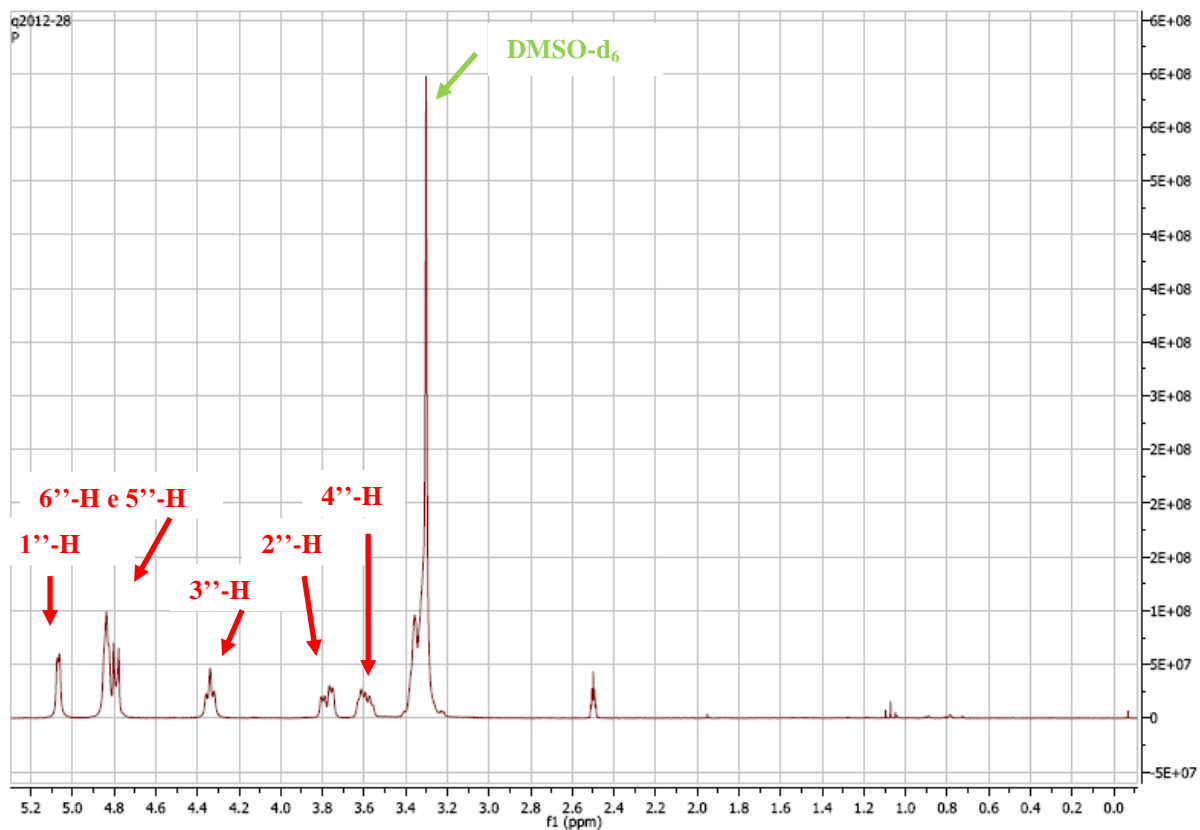
A reacção **6** também foi catalisada pela CAL-B que acilou preferencialmente o grupo hidroxilo primário da glucose da polidatina mas aplicou-se o butirato de vinilo como dador de acilo, originando-se a polidatina 6''-monobutirato.



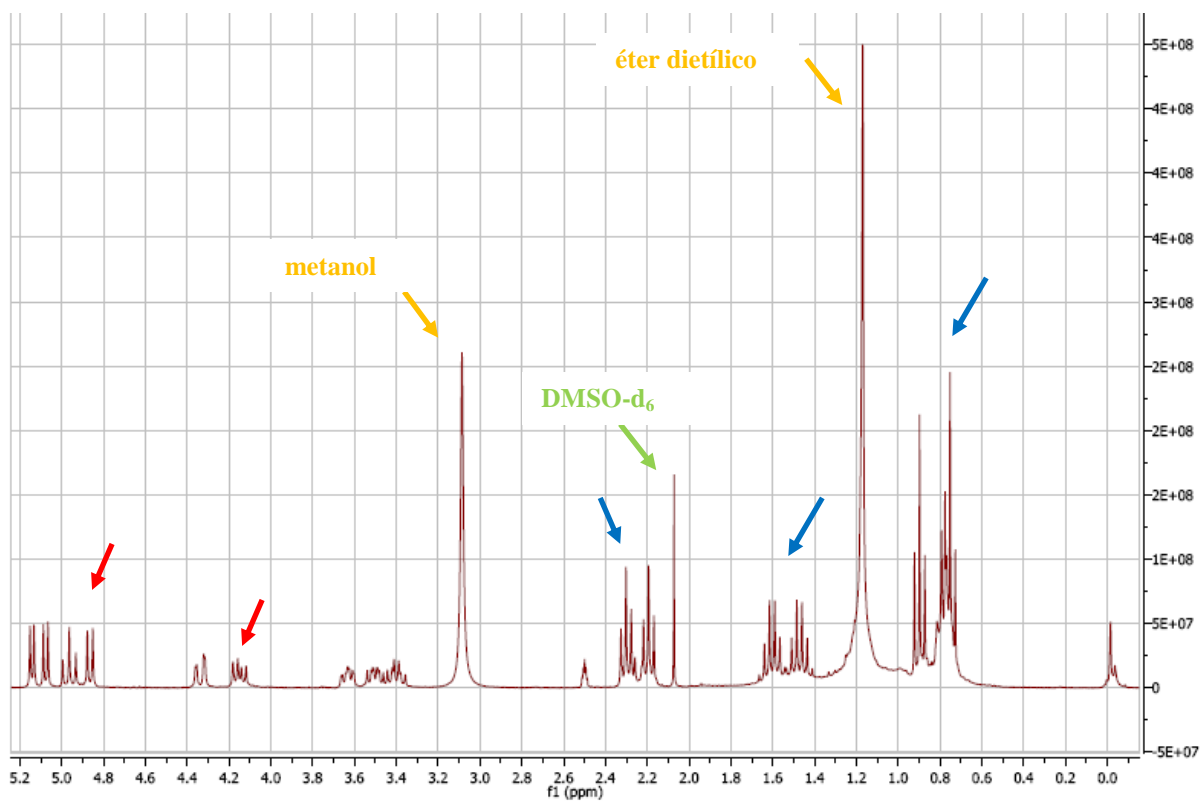
**Figura 21** - Reacção de acilação regioselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monobutirato (produto **6a**), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o butirato de vinilo como dador de acilo.

### 2.2.1.4. Síntese da polidatina 2'',6''-dibutirato

As figuras 22 e 23 ilustram uma zona (da porção glicosídica) dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão da polidatina (com indicação da posição dos protões) e do produto **7a**.



**Figura 22** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina com indicação da posição dos prótons da porção glicosídica e do solvente.



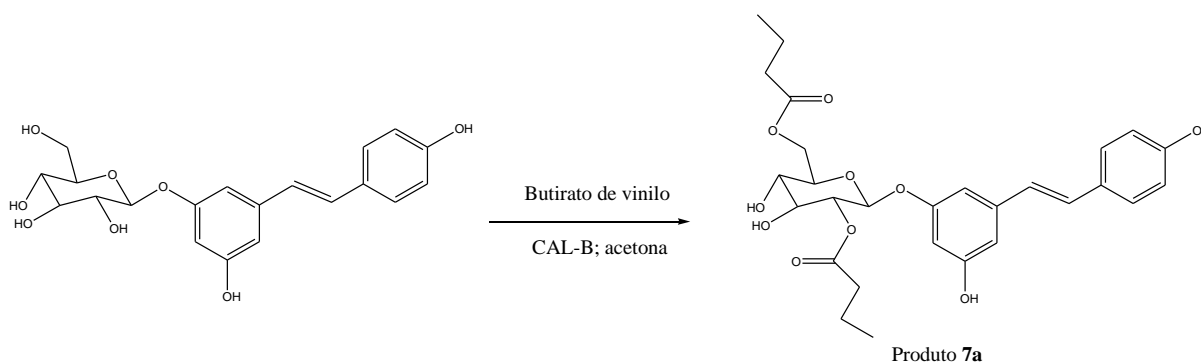
**Figura 23** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto **7a** com indicação do desvio causado pela acilação da polidatina e indicação dos solventes e dos prótons do grupo acilo.

Ao comparar o espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina com o espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto **7a** é possível verificar um desvio dos prótons  $6''\text{-H}$  e  $2''\text{-H}$ . Assim, pode-se afirmar que este derivado da polidatina (produto **7a**) foi acilado na posição  $6''$  e na posição  $2''$ . De facto, a literatura exprime que a CAL-B acila preferencialmente o grupo hidroxilo primário da glucose e, de seguida, os grupos hidroxilo nas posições  $3''$  e  $2''$  (como acontece com a isoquercitrina). Por conseguinte, conclui-se que o derivado formado é a polidatina  $2'',6''$ -dibutirato.

O pico assinalado a verde corresponde ao solvente DMSO- $d_6$ , os picos assinalados a azul correspondem aos prótons do produto acilado e, por fim, os picos assinalados a cor-de-laranja são, possivelmente, o metanol (metanol em DMSO- $d_6$  (s) com desvio químico igual a 3,16 ppm, para RMN  $^1\text{H}$ ) e o éter dietílico (éter dietílico em  $\text{CDCl}_3$  (t) com desvio químico igual a 1,21 ppm, para RMN  $^1\text{H}$ ) pelos valores do desvio químico destes dois picos, indicando que o produto não estava totalmente seco quando foi analisado. Destaca-se que os picos destes solventes também são visíveis no espectro RMN  $^{13}\text{C}$  deste produto.

A partir da análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$  deste produto (figura 33), verifica-se a presença de dois grupos carbonilo, apontando que o produto é diacilado. De igual modo, a partir do espectro de IV do produto **7a** (figura 34), nota-se a presença do grupo carbonilo.

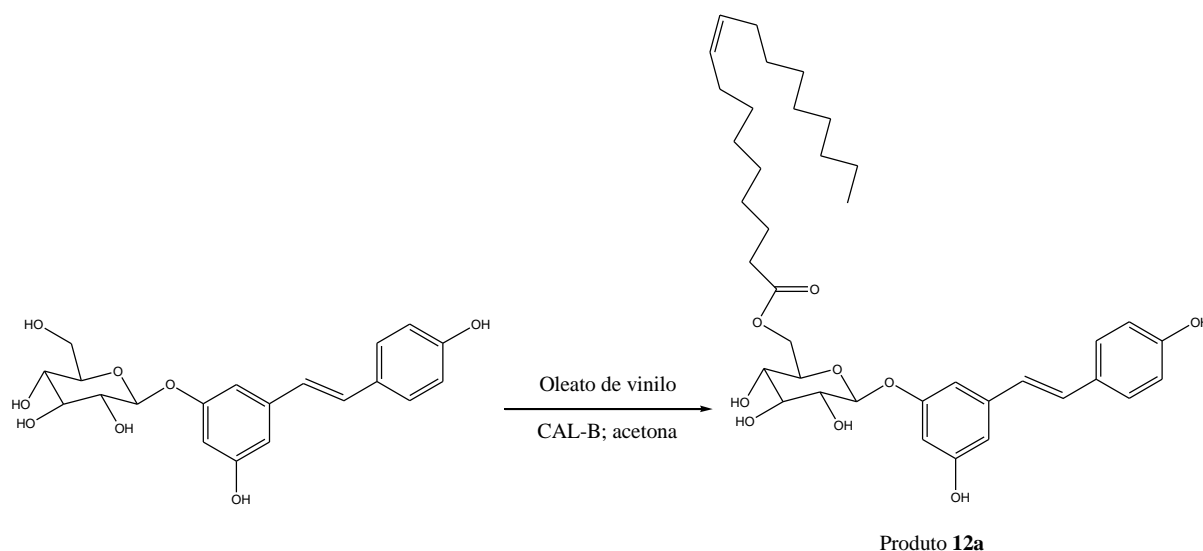
Deste modo, ainda com o butirato de vinilo como dador de acilo, tem-se a reacção **7** em que a catalisou a acilação da polidatina nas posições  $6''$  e  $2''$  da glucose, originando-se a polidatina  $2'',6''$ -dibutirato.



**Figura 24** - Reacção de acilação regiosselectiva para a obtenção da polidatina  $2'',6''$ -dibutirato (produto **7a**), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o butirato de vinilo como dador de acilo.

### 2.2.1.5. Síntese da polidatina 6''-monooleato

Na reacção **12**, utilizou-se oleato de vinilo como agente acilante e a CAL-B como biocatalisador. Esta acilou a polidatina no álcool primário da sua glucose, originando-se a polidatina 6''-monooleato.



**Figura 25** - Reacção de acilação regiosselectiva para a obtenção da polidatina 6''-monooleato (produto **12a**), aplicando a CAL-B como biocatalisador e o oleato de vinilo como dador de acilo.

Nas reacções em maior escala, também tentou-se obter os derivados diacilados para os seguintes dadores de acilo: decanoato de vinilo (reacção **5**) e oleato de vinilo (reacção **11**); no entanto, foi delicado a obtenção destes derivados, uma vez que, com base nos cromatogramas, obtinha-se uma mistura de produtos (difíceis de separar), as suas presenças evidenciavam-se de forma pouco substancial na análise dos cromatogramas, não se conseguindo obter produtos em quantidades relevantes e com bons rendimentos. Além disso, reparou-se que esses mesmos derivados já vinham contaminados com o próprio agente acilante, o que dificultou a sua obtenção.

Em relação a reacção **10** (com anidrido succínico como agente acilante e a CAL-B como biocatalisador), a evolução da reacção, controlada por CCF, ao fim de quatro dias permitiu concluir que não ocorreu reacção, permanecendo o material de partida no cromatograma.

Por fim, com as duas reacções com cinamato de vinilo (reacções **8** e **9**) como agente acilante, não foi possível obter derivados quer monoacilados quer diacilados, pois, a partir da análise dos cromatogramas, verificou-se uma mistura de produtos, difíceis de separar.



### III. Conclusões

A recente aplicação da biocatálise provém da crescente procura de processos químicos mais aceitáveis de um ponto de vista ambiental e económico.

Além disso, a catálise enzimática apresenta inúmeras vantagens que explicam o seu uso cada vez mais importante em diversas áreas.

Os compostos polifenólicos glicosilados são moléculas biologicamente activas. A modificação destes compostos por métodos químicos é uma tarefa complicada visto serem compostos glicosilados polifuncionalizados, por isso, neste trabalho, empregou-se métodos enzimáticos.

Realizou-se, neste estudo, transformações enzimáticas regioselectivas num estilbeno glicosilado. Efectivamente, os compostos polifenólicos glicosilados são cada vez mais estudados, sendo substratos promissores para a obtenção de derivados com possíveis actividades biológicas.

Este estudo permitiu estudar modificações estruturais da polidatina, através da biocatálise, de modo a melhorar as suas propriedades biológicas e farmacológicas.

A partir deste estudo conclui-se que ambas as lipases testadas, a CAL-B e a lipase PS, possuem afinidades para a polidatina, uma vez que esta foi reactiva. A maioria dos estudos, referentes a acilação enzimática regioselectiva de compostos polifenólicos glicosilados, utiliza como enzimas a CAL-B, principalmente, e a lipase PS.

Os resultados deste trabalho demonstram que a CAL-B e a lipase PS têm a capacidade de diferenciar grupos hidroxilo na porção glicosídica e na porção aglicona da polidatina e, assim, possibilitou a obtenção de derivados mono- e diacilados com bons rendimentos. Na verdade, tanto a CAL-B como a lipase PS dirigem preferencialmente a acilação na porção glicosídica do substrato glicosilado. Em particular, a *Novozym* 435 acila primeiramente a posição C-6'' da glucose da polidatina, originando monoésteres (o que também acontece com a lipase PS); e, quando se pretendem diésteres, esta lipase dirige, seguidamente, a acilação na posição C-2'', igualmente na porção glicosídica do mesmo substrato.

Portanto, de um modo geral, os resultados obtidos indicam que essas duas lipases são adequadas na esterificação, de forma selectiva, de um ou vários grupos hidroxilo da porção glicosídica deste composto, originando tanto mono- e diésteres com razoável regioselectividade e bons rendimentos.

Ao comparar os espectros RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  da polidatina com os dos produtos, foi possível observar certos desvios nos espectros dos derivados que indicam a posição de acilação desses mesmos.

É de salientar que, neste trabalho não foi possível o estudo das suas prováveis melhores propriedades físicas e químicas, assim como das suas bioactividades, sendo esse mesmo estudo interessante para investigações posteriores.

Por conseguinte, este trabalho pode constituir um método de base para estudos futuros acerca da acilação enzimática regiosselectiva de compostos polifenólicos glicosilados com vista a obtenção de derivados com possíveis melhores propriedades físicas e químicas e, também, possíveis novas bioactividades.

## IV. Bibliografía

Aburjai, T. A. Anti-platelet stilbenes from aerial parts of *Rheum palaestinum*. *Phytochemistry*, **2000**, *55*, 407-10.

Adameczak, M.; Krishna, S. H. Strategies for Improving Enzymes for Efficient Biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, *42* (4) 251–264.

Ajila, C. M.; Naidu, K. A.; Bhat, S. G.; *et al.* Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chem.*, **2007**, *105*, 982–988.

Ajila, C. M.; Prasada Rao, U. J. S. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, *46*, 303–309.

Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; *et al.* Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.*, **2006**, *24*, 281–287.

Alluis, B.; Dangles, O. Quercetin (=2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one) glycosides and sulfates: chemical synthesis, complexation, and antioxidant properties. *Helv. Chim.*, **2001**, *Acta* 84, 1133–1156.

Anastas, P. T.; Heine, L. G.; Williamson, T. C. Green Chemical Syntheses and Processes: Introduction. In *Green Chemical Syntheses and Processes*; Anastas, P. T., Heine, L. G., Williamson, T. C., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **2000**; Chapter 1.

Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry, *Acc. Chem. Res.* **2002 a**, *35*, 686–694.

Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **2002 b**, *35*, 686-694.

Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M.; Williamson, T. C. Catalysis as a Foundational Pillar of Green Chemistry. *Appl. Catal. A: Gen.*, **2001**, *221* (1-2), 3-13.

Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, **1998 a**, p. 30.

Anastas, P. T.; Williamson, T. C. Frontiers in green chemistry, *Green Chem.* **1998 b**, 1–26.

Arcos, J. A.; Bernabé, M.; Otero, C. Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl sorbitol esters. *Biotechnol. Bioeng.*, **1998 a**, *60*, 53–60.

Arcos, J. A.; Bernabé, M.; Otero, C. Quantitative enzymatic production of 6-acylglucose esters. *Biocatal. Biotransform.*, **1998 b**, *57*, 505–509.

Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Ognier, S.; *et al.* Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J. Biotechnol.*, **2004**, 110, 265–272.

Arora, A.; Nair, M. G; Strasburg, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, 356, 133–141.

Arts, I. C.; Hollman, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81, 317S-325S.

Babu, K. S.; Tiwari, A. K.; Srinivas, P. V.; *et al.* Yeast and mammalian R-glucosidase inhibitory constituents from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall. Ex Meisson. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 3841-3845.

Bavaresco, L.; Fregoni, C.; Cantu, E.; *et al.* Stilbene Compounds: From the Grapevine to Wine. *Drugs Exp Clin Res.*, **1999**, 25: 57-63.

Benbrook, C. M. Elevating Antioxidant Levels in Food through Organic Farming and Food Processing. *The Organic Center*, January **2005**. [http://www.organic-center.org/Antioxidant\\_SSR.pdf](http://www.organic-center.org/Antioxidant_SSR.pdf), accessed on August 19, **2005**.

Bertelli, A. A.; Ferrara, F.; Diana, G.; *et al.* Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *Int J Tissue React.*, **1999**, 21:93–104.

Bertinotti, A.; Carrea, G.; Ottolina G.; *et al.* Regioselective esterification of polyhydroxylated steroids by *candida-antarctica* lipase-B. *Tetrahedron*, **1994**, 50, 13165.

Biasutto, L.; Marotta, E.; Bradaschia, A.; *et al.* Soluble polyphenols: Synthesis and bioavailability of 3,4',5-tri(α-D-glucose-3-O-succinyl) resveratrol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 6721-6724.

Boland, W.; Fröbl, C.; Lorenz, M. Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis*, **1991**, 1049-72.

Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. Application of enzymes as catalysts: basic chemicals, fine chemicals, food, crop protection, bulk pharmaceuticals. In *Biocatalysis. Fundamentals and Applications*, **2004 b**, Wiley-VCH, pp. 159-208.

Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. Introduction to Biocatalysis. In *Biocatalysis*, **2004 a**, Wiley-VCH, pp. 1-18.

Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. Nucleophilic catalysis. In *Biocatalysis. Fundamentals and Applications*, **2004 c**, Wiley-VCH, pp. 261-268.

Bonrath, W.; Karge, R.; Netscher, T. Lipase-catalysed transformations as key-steps in the large-scale preparation of vitamins. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2002**, 19–20, 67–72.

Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Sereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, **2005**.

Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **1990**, 343, 767–770.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources. Metabolism and nutraceutical significance. *Nutr. Rev.*, **1998**, 56, 317–333.

Broadhurst, C. L.; Polansky, M. M.; Anderson, R. A. Insulinlike activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 849–852.

Busquets, S.; Ametller, E.; Fuster, G.; *et al.* Resveratrol, a natural diphenol, growth in an experimental reduces metastatic cancer model. *Cancer Lett.*, **2007**, 245, 144–148.

Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Pinheiro, H.; *et al.* Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. *Journal of Biotechnology*, **1997**, 59, 133–143.

Cai, Y.-Z.; Sun, M.; Xing, J.; *et al.* Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants, *Life Sciences*, **2006**, 78, 2872–2888.

Campbell, M. K.; *Biochemistry*, 2nd ed., Saunders College Publication, **1995**.

Cantos, E.; Espin, J. C.; Fernandez, M. J.; *et al.* Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J Agric Food Chem.*, **2003**, 51: 1208–14.

Carando, S.; Teissedre, P. L.; Pascual-Martinez, L.; *et al.* Levels of flavan-3-ols in French wines. *J Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 4161–4166.

Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology*, **1995**, 13, 63–70.

Carrea, G.; Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2226–2254.

Cesti, P.; Zaks, A.; Klibanov, A. M. Preparative regioselective acylation of glycols by enzymatic transesterification in organic solvents. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1985**, 11, 401–407.

Chebil, L.; Anthoni, J.; Humeau, C.; *et al.* Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 9496–9502.

Chebil, L.; Humeau, C.; Falcimaigne, A.; *et al.* Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 2237–2251.

Chen, K.; Arnold, F. H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments - sequential random mutagenesis of subtilisin-e for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 5618-5622.

Chênevert, R.; Pelcha, N.; Jacques, F. *Curr. Org. Chem.*, **2006**, 10, 1067–1094.

Cheng, Y.; Zhang, H. T.; Sun, L.; *et al.* Involvement of cell adhesion molecules in polydatin protection of brain tissues from ischemia–reperfusion injury. *Brain Res.*, **2006**, 1110, 193–200.

Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguene, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, **2009**, 177, 143–155.

Chung, M. I.; Teng, C. M.; Cheng, K. L.; *et al.* An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Med.*, **1992**, 58, 274-276.

Clifford, A. J.; Ebeler, S. E.; Ebeler, J. D.; *et al.* Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, 64, 748-756.

Cole, G.M.; Lim, G.P.; Yang, F.; *et al.* Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiol. Aging*, **2005**, 26 Suppl. 1, 133-136.

Collins, T. J.; Gordon-Wylie, S. W.; Bartos, M. J.; *et al.* The design of green oxidants. In *Green Chemistry: Frontiers in Benign Chemical Syntheses and Processes*; Anastas, P. T., Williamson, T. C., Eds.; Oxford University Press: New York, **1998**; Chapter 3.

Cos, P.; De Bruyne, T.; Apers, S.; *et al.* Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.*, **2003**, 69: 589-99.

Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; *et al.* Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 71–76.

Creighton, T. E. *Proteins* (Freeman, New York), **1983**.

Dai, J.; Mumper R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *molecules*, **2010**, 15, 7313-7352.

Danieli B.; Riva, S. Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural-products. *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66, 2215-2218.

Danieli, B.; Bertario, A.; Carrea, G.; *et al.* Chemo-enzymatic synthesis of 6''-O-(3-arylprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin. *Helv Chim Acta*, **1993**, 76:2981-2991.

Danieli, B.; De Bellis, P.; Carrea, G.; *et al.* Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides. *Heterocycles*, **1989**, 29:2061-4.

Danieli, B.; De Bellis, P.; Carrea, G.; *et al.* Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helv Chim Acta*, **1990**, 73:1837-44.

Danieli, B.; Luisetti, M.; Riva, S.; *et al.* Regioselective enzyme-mediated acylation of polyhydroxy natural compounds - a remarkable, highly efficient preparation of 6'-O-acetyl and 6'-O-carboxyacetyl ginsenoside-RG1. *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 3637-3642.

Danieli, B.; Luisetti, M.; Sampognaro, G.; *et al.* Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *J. Mol. Catal. B-Enzymatic*, **1997**, 3, 193-201.

Davis, B. G.; Boyer, V. Biocatalysts and enzymes in organic synthesis. *Nat Prod Rep.*, **2001**, 18:618-640.

de la Lastra, C. A.; Villegas, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, 49, 405-430.

De Stefani, E.; Correa, P.; Boffetta, P.; *et al.* Dietary patterns and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Gastric Cancer*, **2004**, 7: 211-20.

Degueil-Castaing, M.; De Jeso, B.; Drouillard, S.; *et al.* Enzymatic reactions in organic synthesis: 2- ester interchange of vinyl esters. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 953-954.

Delaunois, B.; Cordelier, S.; Conreux, A.; *et al.* Molecular engineering of resveratrol in plants, *Plant Biotechnol. J.*, **2009**, 7, 2-12.

Dercks, W.; Creasy, L. L. Influence of foseyl-AL on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol Mol Plant Pathol.*, **1989 a**, 34, 203-213.

Dercks, W.; Creasy, L. L. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol Mol Plant Pathol.*, **1989 b**, 34, 189-202.

Dixon, R. A.; Paiva, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, **1995**, 7, 1085-1097.

Donaldson, M. S. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr. J.*, **2004**, 3: 19.

Drauz, K.; Waldmann, H. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, *Wiley-VCH*, **2002**, vol. II, p. 361-362.

Drauz, K.; Waldmann, H.; eds. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Vols. 1, 2. New York: VCH Publ.*, **1995**, 404, pp. 545.

Drozozowski, A. M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z. S.; *et al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, **1991**, 351, 491-494.

Du, J.; Sun, L. N.; Xing, W. W.; *et al.* Lipid-lowering effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* in hyperlipidemic hamsters. *Phytomedicine*, **2009**, 16, 652-658.

Ehala, S.; Vaher, M.; Kaljurand, M. Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.*, **2005**, 53, 6484-90.

Enaud, E.; Humeau, C.; Piffaut, B.; *et al.* Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *J Mol Catal B.*, **2004**, 27:1\_6.

Espin, J. C; Wichers, H. J. Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *J. Food Biochem.*, **2000**, 24, 225-250.

Esterbauer, H.; Ramos, P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL, *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.*, **1996**, 127, 31-64.

Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd ed., Springer: Berlin, **1997**.

Faber, K.; Riva, S. Enzyme-catalyzed irreversible acyl transfer. *Synthesis*, **1992**, 895-910.

Fabris, S.; Momo, F.; Ravagnan, G.; *et al.* Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry*, **2008**, 135, 76-83.

Fan, X.; Mattheis, J. P. Inhibition of oxidative and antioxidative enzymes by trans-resveratrol. *J. Food Sci.*, **2001**, 66, 200-203.

Fang, J. G.; Lu, M.; Chen, Z. H.; *et al.* Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chemistry*, **2002**, 8, 4191-4198.



Farell, R. L.; Hata, K.; Wall, M. B. solving pitch problems in pulp and paper processes by the use of enzymes or fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **1997**, 57:197-212.

Fauconneau, B.; Waffo-Téguo, P.; Huguet, F.; *et al.* Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* **1997**, 61, 2103-2110.

Fei, H.H.; Xiao, Z. D.; Gao, W. Effects of giant knotweed rhizome medicine on the expressions of RAGE and VEGF of rats with diabetic nephropathy. *J. Shandong Univ. (Health Sci.)*, **2008**, 46, 43-47.

Fossen, T.; Cabrita, L.; Andersen, O. M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chem.*, **1998**, 63:435-40.

Frankel, E.; Kanner, J.; German, J.; *et al.* Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **1993 a**, 341, 454-457.

Frankel, E.; Waterhouse, A.; Kinsella, J. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, **1993 b**, 341, 1103- 1104.

Fremont, L.; Belguendouz, L.; Delpal, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Science.*, **1999**, 64, 2511.

Fritzemeier, K. H.; Kindl, H. Coordinate Induction by UV-light of Stilbene Synthase, Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase in Leaves of *Vitaceae*. *Planta*, **1981**, 151, 48-52;

Gao, C.; Mayon, O.; MacManus, D. A.; *et al.* Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnol Bioeng.*, **2001**, 71:235-43.

Gao, X. P.; Zhang, W. Y.; Zou, W. J.; *et al.* Screening for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from extracts of traditional Chinese medicine. *Nat. Prod. Res. Dev.*, **2003**, 15,536-538.

García-Junceda, E.; García-García, J. F.; Bastida, A.; *et al.* Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, 12, 1817-1834.

Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Rhodes, M. J. C.; *et al.* Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biol. Med.*, **1998**, 25, 19-25.

Genkinger, J. M.; Platz, E. A.; Hoffman, S. C.; *et al.* Fruit, vegetable, and anti-oxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. *Am J Epidemiol.*, **2004**, 160:1223-33.

Geronikaki, A. A.; Gavalas, A. M. Antioxidants and inflammatory disease: Synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **2006**, 9, 425–442.

Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-1754.

Gilly, R.; Mara, D.; Oded, S.; *et al.* Resveratrol and a novel tyrosinase in Carignan grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1479–1485.

Godfrey, T.; West, S.; eds. *Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry.* New York: Stockton., **1996**, 512 pp., 2<sup>nd</sup> ed.

Godichaud, S.; Krisa, S.; Couronne, B.; *et al.* Deactivation of Cultured Human Liver Myofibroblasts by Trans-resveratrol, a Grapevine-Derived Polyphenol. *Hepatology*, **2000**, Vol. 31, No. 4, 922-931.

Golberg, D. M.; Karumanxhiri, A.; Ng, E.; *et al.* A direct gas chromatographic-mass spectrometric method to assay cis-resveratrol in wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1995 c**, 43:1245-50.

Goldberg, D. M. Does wine work. *Clinic. Chem.* **1995 a**, 41, 14-16.

Goldberg, D. M.; Ng, E.; Karumanchiri, A.; *et al.* Resveratrol glucosides are important components of commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 415–420.

Goldberg, D. M.; Ng, E.; Kerumanchiri, A.; *et al.* The assay of resveratrol glycosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **1995 b**, 708:89-98.

Gonzaga de Oliveira, L.; Moraes Mantovani S. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Quim. Nova*, **2009**, Vol. 32, No. 3, 742-756.

Gonzalez Urena, A.; Orea, J. M.; Montero, C.; *et al.* Improving postharvest resistance in fruits by external application of *trans*-resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 82-89.

Gonzalez-Barrio, R.; Vidal-Guevara, M. L.; Tomas-Barberan, F. A.; *et al.* Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.*, **2009**, 10, 374 – 382.

González-Sabín, J.; Morán-Ramallal, R.; Rebolledo, F. Regioselective enzymatic acylation of complex natural products: expanding molecular diversity. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5321–5335.

Gronbaek, M.; Deis, A.; Sorensen, T.; *et al.* Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *Br. Med. J.* **1995**, 310, 1165-1169.

Guisán, J. M.; Bastida, A.; Cuesta, C.; *et al.* Immobilization stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde agarose gels. *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, 38, 1144-1152.

Haddad, A. Q.; Venkateswaran, V.; Viswanathan, L.; *et al.* Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer P. D.*, **2006**, 9: 68-76.

Halling, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media - theory, tests, and recommendations for experimental-design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, **1994**, 16, 178-206.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, **1999**.

Hanefeld, U. Reagents for (ir)reversible enzymatic acylations. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2405-2415.

Hanzlikova, I.; Melzoch, K.; Filip, V.; *et al.* *Food Sci.*, **2000**, 18, 212–214.

Haraguchi, H. Antioxidative plant constituents, in: *Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, Characterisation and Biological Properties. C. Tringali (Ed.), Chapter 9, Taylor & Francis, London, 2001*, p. 337.

Hart, J. H. Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1981**, 19, 437-458.

Hea, H.; Zhao, Y.; Chen, X.; *et al.* Quantitative determination of *trans*-polydatin, a natural strong anti-oxidative compound, in rat plasma and cellular environment of a human colon adenocarcinoma cell line for pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, **2007**, 855, 145–151.

Henry-Vitrac, C.; Desmoulière, A.; Girard, D.; *et al.* Transport, deglycosylation, and metabolism of *trans*-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr.*, **2006**, 45:376–382.

Heredia, A.; Davis, C.; Redfield, R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, **2000**, 25(3):246–255.

Hertog, M.G.; Feskens, E. J.; Hollman, P.C.; *et al.* Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr. Cancer* **1994**, 22, 175-184.

Hills, W. E.; Hasegawa, M. *Biochem. J.*, **1962**, 83, 503.

Hollman, P. C. H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharm. Biol.*, **2004**, 42, 74 – 83;

Hollman, P. C. H.; de Vries, J. H. M.; van Leeuwen, S. D.; *et al.* Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 62, 1276-1282.

Hung, L. M.; Chen, J. K.; Huang, S.S.; *et al.* Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, **2000**, 47, 549.

Ibern-Gómez, M.; Roig-Pérez, S.; Lamuela-Raventós, R. M.; *et al.* Resveratrol and Piceid Levels in Natural and Blended Peanut Butters. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 6352-6354.

Ikan, R. Naturally Occurring Glycosides, *John Wiley & Sons, Chichester*, **1999**.

Ishihara, K.; Nakajima, N. Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2003**, 23, 411–417.

Jacobsen, E. E.; Anthonsen, T. Water content influences the selectivity of CALB-catalyzed kinetic resolution of phenoxymethyl-substituted secondary alcohols. *Can. J. Chem.*, **2003**, 80, 577–581.

Jaeger, K.-E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, **1999**, 53, 315–51.

Jaeger, K.-E.; Reetz, M. T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **1998**, 16:396-403.

Jang, M. S.; Cai, E. N.; Udeani, G. O.; *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **1997**, 275, 218–220.

Jayatilake, G. S.; Jayasuriya, H.; Lee, E.-S.; *et al.* Kinase Inhibitors from Polygonum Cuspidatum. *Journal of Natural Products*, **1993**, Vol. 56, No. 10, pp. 1805-1810.

Jeandet, P.; Bessis, R.; Gautheron, B. The production of resveratrol (3,5,4- $\beta$ -trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1991**, 42, 41-46.

Jeandet, P.; Bessis, R.; Maume, B.F.; *et al.* Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J. Agric. Food Chem.*, **1995 a**, 43, 316-319.

Jeandet, P.; Bessis, R.; Sbaghi, M.; *et al.* Occurrence of a resveratrol  $\beta$ -D-glucoside in wine: preliminary studies. *Vitis*, **1994**, 33:183-184.

Jeandet, P.; Bessis, R.; Sbaghi, M.; *et al.* Production of phytoalexin resveratrol by grapes in response to botrytis attack under natural conditions. *J Phytopathol.*, **1995** *b*, 143, 135-9.

Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A. C.; Bessis, R.; *et al.* Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2731–2741.

Ji, H.; Zhang, X.; Du, Y.; *et al.* Polydatin modulates inflammation by decreasing NF- $\kappa$ B activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood–brain barrier permeability for its neuroprotective effect in pMCAO rat brain. *Brain Research Bulletin*, **2012**, 87, 50– 59.

Jin, C. H.; Zhao, K. S. The effect and mechanism of Polydatin in shock treatment. In: *Molecular Mechanism of Severe Shock*, edited by Zhao KS and Xu Q. Kerala, India: Research Signpost, **2009**, p. 191–223.

Jones, J. B. Enzymes in organic-synthesis. *Tetrahedron*, **1986**, 42, 3351-3403.

Juan, M. E.; Vinardell, M. P.; Planas, J. M. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr.*, **2002**; 132: 257-60.

Jung, J. C.; Lim, E.; Lee, Y.; *et al.* Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 3166–3174.

Kaldas, M. I.; Walle, U. K.; Walle, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol.*, **2003**; 55: 307-12.

Kang, S. S.; Cuendet, M.; Endringer, D. C.; *et al.* Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF $\kappa$ B. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 1044–1054.

Kauzmann, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **1959**, 14, 1-63.

Kawada, N.; Seki, S.; Inoue, M.; *et al.* Possible involvement of cyclin expression in proliferation of rat stellate cell in culture. *Hepatology*, **1998**, 27, 1265.

Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E. A structure-based rationalization of the enantioselectivity of subtilisin toward secondary alcohols and isosteric primary amines. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **1997**, 3, 65-72.

Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; *et al.* A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia* and lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, 56, 2656–2665.

Kerem, Z.; Bilkis, I.; Flaishman, M. A.; *et al.* Antioxidant activity and inhibition of alpha-glucosidase by trans-resveratrol, piceid, and a novel trans-stilbene from the roots of Israeli *Rumex bucephalophorus* L. *J Agric Food Chem.*, **2006 a**, 54: 1243–1247.

Kerem, Z.; Chetrit, D.; Shoseyov, O.; *et al.* Protection of lipids from oxidation by epicatechin, trans-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **2006 b**, 54, 10288–10293.

Khmelnitsky, Y. L.; Budde, C.; Arnold, J. M.; *et al.* Synthesis of water-soluble paclitaxel derivatives by enzymatic acylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11554-11555.

Khmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; *et al.* Enzyme Microb. Technol. 1988, 10, 710. (b) Brink, L. E. S.; Tramper, J.; Luyben, K.Ch.A.M.; Van't Riet, K. *Enzyme Microb. Technol.*, **1988**, 10, 736.

Kikuchi, M.; Ohnishi, K.; Harayama, S. Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. *Gene*, **1999**, 236, 159-167.

Kimura, Y.; Okuda, H. Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine, on tumour growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2000**, 52, 1287–1295.

Kimura, Y.; Okuda, H.; Arachi, S. Effects of stilbene on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 834, 275-278.

King, R. E.; Bomser, J. A.; Min, D. B. Bioactivity of resveratrol. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2006**, 5, 65–70.

Klibanov, A. M. *Chemtech*, **1986**, 16, 354.

Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic-solvents. *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, 14, 141-144.

Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 409, 241-246.

Klibanov, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*, **1997**, 15, 97-101.

Koeller, K. M.; Wong, C.-H. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, **2001**, 409, 232-240.

Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; *et al.* Lipasecatalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J Mol Catal B: Enzym.*, **2003**, 21:59–62.

Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; *et al.* Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur J Lip Sci Technol.*, **2001**, 103:655–60.

Koskinen, A. M. P.; Klibanov, A. M., eds *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Blackie Academic & Professional, **1996**.

Krieger, N.; Bhatnagar, T.; Baratti, J. C.; *et al.* Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42 (4) 279–286.

Kubo, M.; Kimura, Y.; Shin, H.; *et al.* *Skoyakugaku Zasshi*, **1981**, 35, 58.

Kuhnle, G.; Spencer, J. P. E.; Chowrimootoo, G.; *et al.* Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 272, 212–217.

Kumar, P.; Naidu, V.; Gupta, P. Application of hydrolytic kinetic resolution (HKR) in the synthesis of bioactive compounds. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 2745–2785.

Kuntz, I. D. Jr.; Kauzmann, W. Hydration of proteins and polypeptides. *Advances in Protein Chemistry*, **1974**, 28, 239–345.

Kurz, T.; Terman, A.; Gustafsson, B.; *et al.* Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol.*, **2008**, 129: 389–406.

Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; *et al.* Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, **1987**, Vol. XXX, pp. 81–87.

Lamuela-Raventós, R. M.; Romero-Pérez, A. I.; Waterhouse, A. L.; *et al.* Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 281–283.

Lamuela-Raventós, R. M.; Waterhouse, A. L. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J. Agr. Food Chem.*, **1993**, 41:521–523.

Langcake, P.; Cornford, C. A.; Pryce, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* grape leaves tested on *Cladisporium cucumerinum* and *Plasmopara viticola*, fungi. *Phytochemistry*, **1979**, 18, 1025–1027.

Langcake, P.; Pryce, R. J. New class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, **1977**, 33, 151–152.

Langcake, P.; Pryce, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection. *Physiol. Plant Pathol.*, **1976**, 9, 77–86.

Lanz, T.; Schröder, G.; Schröder, J. Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea* L., *Planta*, **1990**, 181, 169–175.

Lanzilli, G.; Cottarelli, A. ; Nicotera, G. ; *et al.* *Inflammation*, **2011**, doi:10.1007/s10753-011-9310-z.

Lanzilli, G.; Cottarelli, A.; Nicotera, G.; *et al.* Anti-inflammatory Effect of Resveratrol and Polydatin by In Vitro IL-17 Modulation. *Inflammation*, **2012**, Vol. 35, No. 1.

Larrosa, M.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *Eur. J. Nutr.*, **2004**, 43, 275–284.

Li, R.-P.; Wang, Z.-Z.; Sun, M.-X.; *et al.* Polydatin protects learning and memory impairments in a rat model of vascular dementia. *Phytomedicine*, **2012**, 1-5.

Li, Y. H.; Wen, S. P.; Kota, B. P.; *et al.* *Punica granatum* flower extract, a potent R-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 99, 239- 244.

Liang, R. N.; Mo, Z. X. Protective effects of polydatin, an active compound from *Polygonum cuspidatum*, on cerebral ischemic damage in rats. *Chin Pharmacol Bull.*, **1996**, 12: 126–129.

Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations: A Collection of Processes*, VCH, Weinheim, **2000**.

Liese, A.; Seelback, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.

Lim, E.; Bowles, D. *BIOforum Eur.*, **2008**, 9, 32-34.

Liu, C. D.; Wen, Y. Y.; Chiou, J. M.; *et al.* Comparative characterization of peanuts grown by aquatic floating cultivation and field cultivation for seed and resveratrol production. *J Agric Food Chem.*, **2003**, 51: 1582-5.

Lu, R.; Serrero, G. Resveratrol, a Natural Product Derived From Grape, Exhibits Antiestrogenic Activity and Inhibits the Growth of Human Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Physiology*, **1999**, 179:297–304.

Lucas, R.; Alcantara, D.; Morales, J. C. A concise synthesis of glucuronide metabolites of urolithin-B, resveratrol, and hydroxytyrosol. *Carbohydrate Research*, **2009**, 344, 1340 – 1346.

Luo, S.F., Yu, C.L., Zhang, P.W. Influences of 3,4',5-trihydroxystibene 3- betamono-d-glucoside on beat rate and injury of cultured newborn rat myocardial cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, **1990**, 11, 147–150.

Lyons, M. M.; Yu, C.; Toma, R. B.; *et al.* Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J Agric Food Chem.*, **2003**, 51: 5867-70.

Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Jay-Allemant, C. Un Exemple de Métabolites Secondaires d'Importance Économique. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, **2005**, pp. 1.



Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 79, 727-747.

Mannila, E.; Talvitie, A.; Kolehmainen, E. Antileukemic compounds derived from stilbenes in picea-abies bark. *Phytochemistry*, **1993**, 33, 813.

Manzer, L. E. Chemistry and Catalysis: Keys to Environmentally Safer Processes. In *Benign by Design: Alternative Synthetic Design for Pollution Prevention*; Anastas, P. T., Farris, C. A., Eds.; *American Chemical Society: Washington, DC*, **1994**; Chapter 12.

Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, **2000**, 21, 361–370.

Martinez, J.; Moreno, J. J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharm.*, **2000**, 59, 865-870.

Mattivi, F. Solid phase extraction of *trans*-resveratrol from wines for HPLC analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1993**, 196:522-525.

Mattivi, F.; Reniero, F.; Korhammer, S. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1820-1823.

Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; *et al.* Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J Biotechnol.*, **2005**, 116:295–304.

Mellou, F.; Loutrari, H.; Stamatis, H.; *et al.* Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochem.*, **2006**, 41, 2029–2034.

Meng, X.-F.; Maliakal, P.; Lu, H.; *et al.* Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem.*, **2004**, 52, 935–942.

Mérillon, J. M.; Fauconneau, B.; Waffo-Téguo, P.; *et al.* Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clin. Chem.*, **1997**, 43, 1092-1093.

Mérillon, J. M.; Fauconneau, B.; Waffo-Téguo, P.; *et al.* Antioxidant activity of wine phenolic compounds in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. Presented at the 18th International Conference on Polyphenols; Polyphenols Communications 96, Bordeaux (France), July 15-18, **1996**.

Mi Kim, Y.; Yun, J.; Lee, C.-K.; *et al.* Oxyresveratrol and Hydroxystilbene Compounds. Inhibitory Effect on Tyrosinase and Mechanism of Action. *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**, Vol. 277, No. 18, pp. 16340–16344.

Miao, Q.; Wang, S.; Miao, S.; *et al.* Cardioprotective effect of polydatin against ischemia/reperfusion injury: roles of protein kinase C and mito K(ATP) activation. *Phytomedicine*, **2011**, 19, 8–12.

Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **2000**, 52, 673–751.

Mikulski, D.; Molski, M. Quantitative structure antioxidant activity relationship of trans-resveratrol oligomers, *trans*-4,4'-dihydroxystilbene dimer, *trans*-resveratrol-3-*O*-glucuronide, glucosides: *trans*-piceid, *cis*-piceid, *trans*-astringin and *trans*resveratrol- 4'-*O*-beta-*D*-glucopyranoside. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45(6): 2366–2380.

Morales, M.; Ros Barcelo, A.; Pedreno, M. A. Plant stilbenes: recent advances in their chemistry and biology, *Adv. Plant Physiol.*, **2000**, 3, 39–70.

Mosbach, K. Immobilized Enzymes. *Methods in Enzymology*. Vol. 44, Ed.; *Academic Press Inc. London*, **1976**.

Murahashi, S.-I.; Komiya, N.; Oda, Y.; *et al.* Ruthenium-Catalyzed Oxidation of Alkanes with tert-Butyl Hydroperoxide and Peracetic Acid. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 9186-9193.

Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; *et al.* Understanding lipase stereoselectivity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2002**, 18: 81–97.

Naemura, K.; Murata, M.; Tanaka, R.; *et al.* Enantioselective acylation of alcohols catalyzed by lipase QL from *Alcaligenes sp.*: A predictive active site model for lipase QL to identify the faster reacting enantiomer of an alcohol in this acylation. *Tetrahedron Asymmetry*, **1996**, 7, 1581–1584.

Nakajima, N.; Ishihara, K.; Itoh, T.; *et al.* Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J. Biosci. Bioeng.*, **1999**, 87, 105–107.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers: New York, **2000**.

Nicolosi, G.; Spatafora, C.; Tringali, C. Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2002**, 16, 223–229.

Nkondjock, A.; Krewski, D.; Johnson, K. C.; *et al.* Dietary patterns and risk of pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **2005**, 114: 817- 23.

Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. L.; *et al.* The Influence of the Mode of Enzyme Preparation on Enzymatic Enantioselectivity in Organic Solvents and Its Temperature Dependence. *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**, Vol. 51, pp. 95-99.

Oosterom, M. W. V.; Rantwijk, F. V.; Sheldon, R. A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol Bioeng.*, **1996**, 49, 328- 333.

Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K.; *et al.* Lipase as chiral catalysts. *Tetrahedron Asymmetry*, **1995 a**, 6, 3023–3030.

Orrenius, C.; Ohrner, N.; Rotticci, D.; *et al.* *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron Asymmetry*, **1995 b**, 6, 1217–1220.

Orsini, F.; Pelizzoni, F.; Bellini, B.; *et al.* Synthesis of biologically active polyphenolic glycosides (combretastatin and resveratrol series). *Carbohydr. Res.*, **1997 a**, 301, 95–109.

Orsini, F.; Pelizzoni, F.; Verotta, L.; *et al.* Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside and related compounds. *J. Nat. Prod.*, **1997 b**, 60, 1082-1087.

Pace-Asciak, C. R.; Hahn, S.; Diamandis, E. P.; *et al.* The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta*, **1995**, 235, 207-219.

Paganga, G.; Rice-Evans, C. A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.*, **1997**, 401, 78- 82.

Paravidino, M.; Hanefeld, U. Enzymatic acylation: assessing the greenness of different acyl donors. *Green Chemistry*, **2011**, 13, 2651-2657.

Park, J. H.; Lee, J. K. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*, Shinil Books Co. Ltd., Seoul, Korea, **2000**, p. 132.

Pedersen, N. R.; Wimmer, R.; Emmersen, J.; *et al.* Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337:1179- 1184.

Pendurthi, U. R.; Williams, J. T.; Rao, L. V. M. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells - A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, **1999**, 19, 419.

Peng, X.; Yao, D.; Pan, Y. Study on the structural changes of bovine serum albumin with effects on polydatin binding by a multitechnique approach. *Spectrochimica Acta Part A*, **2011**, 81, 209-214.

Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; *et al.* Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **2004**, 65,297–303.

Pezet, R.; Pont, V. Mode of toxic action of Vitaceae stilbenes on fungal cells. In: Daniel M, Purkayastha RP, editors. *Handbook of phytoalexins metabolism and action*. New York: Marcel Dekker, **1995**, p. 317–31.

Price, K. R.; Fenwick, G. R. Naturally occurring oestrogens in foods – a review. *Food Addit. Contam.*, **1985**, 2, 73–106.

Privat, C.; Telo, J. P.; Bernardes-Genisson, V.; *et al.* Antioxidant properties of trans-epsilon-viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50,1213– 1217.

Puupponen-Pimia, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kahkonen *et al.* Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.*, **2001**, 90, 494–507.

Rasmussen, S. E.; Frederiksen, H.; Struntze Krogholm, K.; *et al.* Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, 49, 159-174.

Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; *et al.* Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **2006**, 113, 189 – 207.

Raucher, S.; Bray, B. L. *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2332–2333.

Regev-Shoshani, G.; Shoseyov, O.; Bilkis, I.; *et al.* Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation, *Biochem. J.*, **2003**, 374, 157–163.

Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **1992**, 339, 1523-1526.

Ribeiro de Lima, M. T.; Waffo-Téguo, P.; Teissedre, P. L.; *et al.* Determination of Stilbenes (*trans*-Astringin, *cis*- and *trans*-Piceid, and *cis*- and *trans*-Resveratrol) in Portuguese Wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2666-2670.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; *et al.* The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, **1995**, 22, 375-383.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.*, **1996**, 20:933–56.

Rimando, A. M.; Kalt, W.; Magee, J. B.; *et al.* Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *J Agric Food Chem.*, **2004**, 52: 4713-9.

Rimm, E. B.; Klatsky, A.; Grobbee, D.; *et al.* Review of moderate alcohol- consumption and reduced risk of coronary heart disease: Is the effect due to beer, wine, or spirits? *Br. Med. J.*, **1996**, 312, 731-736.

Riva, S. Biocatalytic modification of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, 5:106–111.

Riva, S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, 19–20, 43–54.

Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A. P. G.; *et al.* Protease catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *J Am Chem Soc.*, **1988**, 110:584-589.

Riva, S.; Danieli, B.; Luisetti, M. A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates. *J Nat Prod.*, **1996**, 59:618–21.

Roggero, J. P.; Archier, P. Quantitative Determination of Resveratrol and of One of Its Glycosides in Wines, *Sci. Aliments*, **1994**, 14, 99–107.

Romero-Pérez, A. I.; Ibern-Gómez, M.; Lamuela-Raventós, R. M.; *et al.* Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1533-1536.

Romero-Pérez, A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; Waterhouse, A. L.; *et al.* Levels on *cis*- and *trans*resveratrol and their glucosides in white and rose´ *Vitis vinifera* wines from Spain. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 2124-2128.

Rosemann, D.; Heller, W.; Sandermann, H. Plant responses to ozone. II. Induction of stilbene biosynthesis in scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings, *Plant Physiol.*, **1991**, 97, 1280–1286.

Roupe, K. A.; Remsberg, C. M.; Yáñez, J. A.; *et al.* Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. *Current Clinical Pharmacology*, **2006**, 1, 81-101 81.

Salem, J. H.; Humeau, C.; Chevalot, I.; *et al.* Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochem.*, **2010**, 45, 382–389.

Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; *et al.* The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building-blocks. *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1071-1140.

Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Reza-Elahi, S. Lipase-catalyzed regio- and stereoselective acylation of hydroxyl groups in steroid side chains. *Monatsh. Chem.*, **2000**, 131, 617-622.

Sarda, L.; Desnuelle, P. Inhibition of lipases by proteins. A kinetic study with dicarpin monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1958**, 30, 513–521.

Sato, M.; Maulik, N.; Das, D. K. Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2002**, 957, 122–135.

Sbaghi, M.; Jeandet, P.; Bessis, R.; *et al.* Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathol.*, **1996**, 45: In Press.

Schrag, J. D.; Cygler, M. Lipases and a/b hydrolase fold. *Methods in Enzymology*, **1997**, 284, 85–107.

Schmid, A. J. S.; Dordick, B.; Hauer, A.; *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **2001**, 409, 258–268.

Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **2001**, 409:258\_268.

Schroeter, H.; Spencer, J. P.; Rice-Evans, C.; *et al.* Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.*, **2001**, 358, 547–557.

Schulze, B.; Wubbolts, M. G. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, **1999**, 10:609–615.

Secundo, F.; Carrea, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, 19–20, 93–102.

Secundo, F.; Carrea, G. Optimization of Hydrolase Efficiency in Organic Solvents. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 3194-3199.

Seignur, M.; Bonnet, J.; Dorian, B.; *et al.* *J. Appl. Cardiol.*, **1990**, 5, 215.

Shan, C. W. Effects of polyatin on platelet aggregation of rabbits. *Acta Pharm. Sin.*, **1988**, 23, 394–396.

Shan, C.; Yang, S.; He, H.; *et al.* Influences of 3,4,5-trihydroxystilbene-3- $\beta$ -D-glucoside on rabbits platelet aggregation and thromboxane B<sub>2</sub> production in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.*, **1990**, 11, 527-530.

Shen, Z. M.; Yin, J. W.; Yuan, H. B. The hypoglycemic effect of tannin from *Polygonum cuspidatum*. *Nat. Prod. Res. Dev.*, **2004**, 16, 220–221.

Shi, Y. Q.; Fukai, T.; Sakagami, H.; *et al.* Cytotoxic and DNA Damage-Inducing Activities of Low Molecular Weight Phenols from Rhubarb. *Anticancer Res.*, **2001**, 21, 2847–2853.

Shim, H.; Hong, W.; Ahn, Y. Enzymatic preparation of phenolic glucosides by *Streptococcus mutans*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2003**, 24, 1680–1682.

Shu, S. Y. *J. Pediatr. Pharm.*, **2002**, 8, 9–11.

Shu, S. Y.; Wang, X. Y.; Ling, Z. Y.; *et al.* Effect of polydatin on phospholipase A2 in lung tissues in rats with endotoxic shock. *J. Traumatol.*, **2004**, 7, 239-243.

Shu, S.; Ling, Z.; Ye, M.; *et al.* Polydatin up-regulates Clara cell secretory protein to suppress phospholipase A2 of lung induced by LPS in vivo and in vitro. *BMC Cell Biol.*, **2011**, 12, 31.

Siemann, E. H.; Creasy, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1992**, 43,49-52.

Sies, H. Polyphenols and health: update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2010**, 501(1): 2–5.

Sih, C. J.; Wu, S. H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. *Topics Stereochem.*, **1989**, 19, 63-125.

Silberberg, M.; Morand, C.; Mathevon, T.; *et al.* The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr.*, **2006**, 45:88–96.

Skupinska, K. A.; McEzchern, E. J.; Baird, I. R.; *et al.* Enzymatic resolution of bicyclic 1-Heteroarylamines using *Candida antarctica* lipase B. *J Org Chem.*, **2003**, 68:3546-3551.

Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. The world of resveratrol. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2001 a**, 492, 159-182.

Soleas, G. J.; Goldberg, D. M.; Diamandis, E. P.; *et al.* A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1995**, 46, 346-352.

Soleas, G. J.; Goldberg, D. M.; Grass, L.; *et al.* Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines? *Clin. Biochem.*, **2001 b**, 24, 415–420.

Spencer, J. P.; Kuhnle, G. G.; Williams, R. J.; *et al.* Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.*, **2003**, 372, 173–181.

Spencer, J. P.; Schroeter, H.; Rechner, A. R.; *et al.* Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxidants Redox Signalling*, **2001**, 3, 1023–1039.

St Léger, A. S.; Cochrane, A. L.; Moore, F. Factors associated with cardiac mortality in developed country particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, **1979**, 1, 1017-1020.

Stecher, H.; Faber, K. Biocatalytic deracemization techniques: Dynamic resolutions and stereoinversions. *Synthesis*, **1997**, 1–16.

Stivala, L. A.; Savio, M.; Carafoli, F.; *et al.* Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 22586-22594.

Stojanovic, S.; Brede, O. Elementary reaction of the antioxidant action of trans-stilbene derivatives: resveratrol, pinosylvin and 4-hydroxystilbene. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**, 4, 757–764.

Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. The production of fine chemicals by biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 548–556.

Su, H. Y.; Cherng, S. H.; Chen, C. C. ; *et al.* Emodin inhibits the mutagenicity and DNA-adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutat. Res.*, **1995**, 329, 205–212.

Suzuki, Y. A.; Murata, Y.; Inui, H.; *et al.* Triterpene glycosides of *Siraitia grosVeneri* inhibit rat intestinal maltase and suppress the rise in blood glucose level after a single oral administration of maltose in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2941-2946.

Tamura, H.; Yamagami, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J Agric Food Chem*, **1994**, 42:1612–5.

Tao, J.; Xu, J.-H. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 13:43–50.

Teissedre, P. L.; Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; *et al.* Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 70, 55-61.

Teng, R.; Ang, C.; McManus, D.; *et al.* Regioselective acylation of ginsenosides by Novozyme 435. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 44:5661\_ 5664.

Teng, R.-W.; Bui, T.-K.-A.; McManus, D.; *et al.* Regioselective acylation of several polyhydroxylated natural compounds by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2005**, 23(2): 109-116.

Tobella, N. N.; Waterhouse, A. L. Fining effects on resveratrol and piceid isomer concentrations in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 352.



Torres, P.; Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J.; *et al.* Enzymatic Synthesis of  $\alpha$ -Glucosides of Resveratrol with Surfactant Activity. *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353, 1077 – 1086.

Torres, P.; Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J.; *et al.* Regioselective Lipase Catalyzed Synthesis of 3-O-Acyl Derivatives of Resveratrol and Study of Their Antioxidant Properties. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 807–813.

Ursini, F.; Sevanian, A. Wine polyphenols and optimal nutrition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2002**, 957, 200–209.

Varache-Lembège, M.; Waffo-Téguo, P.; Decendit, A.; *et al.* Polyhydroxystilbenes from *Vitis vinifera* L. cells: inhibitory effect on human platelet aggregation and molecular modeling. Presented at the 18<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols; Polyphenols Communications 96, Bordeaux (France), July 15-18, **1996**.

Vickery, M. L.; Vickery, B. Secondary Plant Metabolism. *The Macmillan Press Ltd, Hong Kong*, **1981**, vol. 1, pp. 20–55.

Vitrac, X.; Monti, J. P.; Vercauteren, J.; *et al.* Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta.*, **2002**, 458:103–110.

Vrhovsek, U.; Wendelin, S.; Eder, R. Effects of various vinification techniques on the concentration of *cis*- and *trans*resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1997**, 48, 214-219.

Waffo-Téguo, P.; E. Hawthorne, M.; Cuendet, M.; *et al.* Potential Cancer-Chemopreventive Activities of Wine Stilbenoids and Flavans Extracted From Grape (*Vitis vinifera*) Cell Cultures. *Nutrition and Cancer*, **2001 a**, 40(2), 173-179

Waffo-Téguo, P.; Fauconneau, B.; Deffieux, G.; *et al.* Isolation, Identification, and Antioxidant Activity of Three Stilbene Glucosides Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 655-657.

Waffo-Téguo, P.; Lee, D.; Cuendet, M.; *et al.* Two New Stilbene Dimer Glucosides from Grape (*Vitis vinifera*) Cell Cultures, *J. Nat. Prod.*, **2001 b**, 64, 136–138.

Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M. H.; *et al.* High Absorption but very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. *Drug Metabolism and Disposition. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2004**, Vol. 32, No. 12, 32:1377–1382.

Walsh, C. Enabling the chemistry of life. *Nature*, **2001**, 409, 226-231.

Wang, A.; Zhang, F.; Huang, L.; *et al.* New progress in biocatalysis and biotransformation of Flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2010**, Vol. 4(10), pp. 847-856.

Wang, F. Y.; Xu, Z. J.; Zhang, X. L.; *et al.* Protective effects of polydatin against lung ischemia/reperfusion injury and the initial exploration for its mechanism, *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, **2008**, 24, 62–65.

Wang, H.; Liu, L.; Guo, Y.-X.; *et al.* Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **2007**, 75:763–768.

Wang, M.; Jin, Y.; Ho, C.T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food. Chem.*, **1999**, 47, 3974.

Wang, Q. L.; Li, B. Y.; Qiu, S. C.; *et al.* *Med. Mater. Med. Res.*, **2006**, 17, 762–763.

Wang, X.; Song, Bian, R.; H. N.; *et al.* Polydatin, a natural polyphenol, protects arterial smooth muscle cells against mitochondrial dysfunction and lysosomal destabilization following hemorrhagic shock. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **2012**, 302: R805–R814.

Wang, Y. F.; Lalonde, J. J.; Momongan, M.; *et al.* Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols glycerol derivatives sugars and organometallics. *Wong, J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7200–7205.

Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y.; *et al.* An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 431-435.

Waterhouse, A L. The non-flavonoid polyphenolic compounds of grapes and wine which affect nutrition and health. *Proceedings, 74th O.I.V. Assembly General*; Office International de la Vigne et du Vin: Paris, June **1994**; pp 1-10.

Wescott, C. R.; Klibanov, A. M. The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1206, 1–9.

Willet, W. C. Eat, Drink, and Be Healthy: The Harvard Medical School Guide to Healthy Eating, *McGraw-Hill, New York*, **2001**.

Woodley, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology*, **2008**, Vol.26, No.6, pp. 321-327.

Wu, J. M.; Wang, Z. R.; Hsieh, T. C.; *et al.* Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (review). *Int. J. Mol. Med.*, **2001**, 8, 3–17.

Xie, Y.; Zhu, Q. H.; Yan, Y. C.; *et al.* *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.*, **2004**, 15, 615.

Xing, W. W.; Wu, J. Z.; Jia, M.; *et al.* Effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* on lipid profile in hyperlipidemic rabbits. *Biomed. Pharmacother.*, **2009**, 63, 457–462.

Yang, C. S.; Landau, J. M.; Huang, M.-T.; *et al.* Inhibition of Carcinogenesis by dietary Polyphenolic Compounds, *Annu. Rev. Nutr.*, **2001**, 21:381–406.

Youdim, K. A.; Spencer, J. P.; Schroeter, H.; *et al.* Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol. Chem.*, **2002**, 383, 503–519.

Yu, B.; Xing, G.; Hui, Y.; *et al.* Lipase-catalyzed regioselective acylation of diosgenyl saponins. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42:5513\_ 5515.

Yu, C. W.; Shin, Y. G.; Chow, A.; *et al.* Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.*, **2002**, 19, 1907–1914.

Yu, S. H.; Zha, J. P.; Zhan, W. H.; *et al.* Contents comparison of resveratrol and polydatin in the wild *Polygonum cuspidatum* plant and its tissue cultures. *China journal of Chinese materia medica*, **2006**, 31, 637-641.

Zaks, A. Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, 5, 130–136.

Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, Vol. 82, pp. 3192-3196.

Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *The Journal of Biological Chemistry*, **1988 a**, 263, 3194-3201.

Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100-degrees-C. *Science*, **1984**, 224, 1249-1251.

Zaks, A.; Klibanov, A. M. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *The Journal of Biological Chemistry*, **1988 b**, Vol. 263, No. 17, pp. 8017-8021.

Zhang, L. P.; Yang, C. Y.; Wang, Y. P. Protective effect of polydatin against ischemia/reperfusion injury in rat heart, *Acta Physiol. Sinica.*, **2008**, 60, 161–168.

Zhang, W. M.; Yang, Z. Q.; Qing, S. Z. *Prog. Vet. Med.*, **2001**, 22, 41–44.

Zhao, K. S.; Zhu, Z. J.; Wu, G. Y.; *et al.* Huang, Importance of enhancing cardiac function in the treatment of burn shock – Effect of NO 4 of *Polygonum cuspidatum*, in: *Advances in Burns*, C.Y. Sheng *et al.*, eds, International Acad. Publisher, Beijing, China, **1992**, pp. 21–38.

Zhao, K.-s.; Jin, C.; Huang, X.; *et al.* The mechanism of Polydatin in shock Treatment. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **2003**, 29, 211–217.

Zhou, C. S.; Xiang, H. Y.; Xiao, J. B.; *et al.* Quantitative determination of resveratrol and piceid in *Polygonum cuspidatum* Sieb. *et Zucc.* By HPLC. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2005**, 25,534–536.

Zhou, J.-J.; Zhang, H.-J.; Yang, P.-J.; *et al.* Determination of resveratrol glucoside and resveratrol in radix and rhizome of *Polygonum cuspidatum* yielded in Hanzhong Region (in Chinese). *Chinese Traditional and Herbal Drugs (Zhong Cao Yao)*, **2002**, 33:414– 416.

Zhu, Z. J.; Zhao, K. S.; Wu, K. Y.; *et al.* Improvement of microcirculation insufficiency in rats with irreversible hemorrhagic shock by crystal NO 4 of *Polygonum cuspidatum*, *J. Med. Coll. PLA*, **1987**, 2, 191–196.

Zou, J. G.; Wang, Z. R.; Houang, Y. Z.; *et al.* Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Mol. Med.*, **2003**, 11, 317–320.

## V. Apêndices

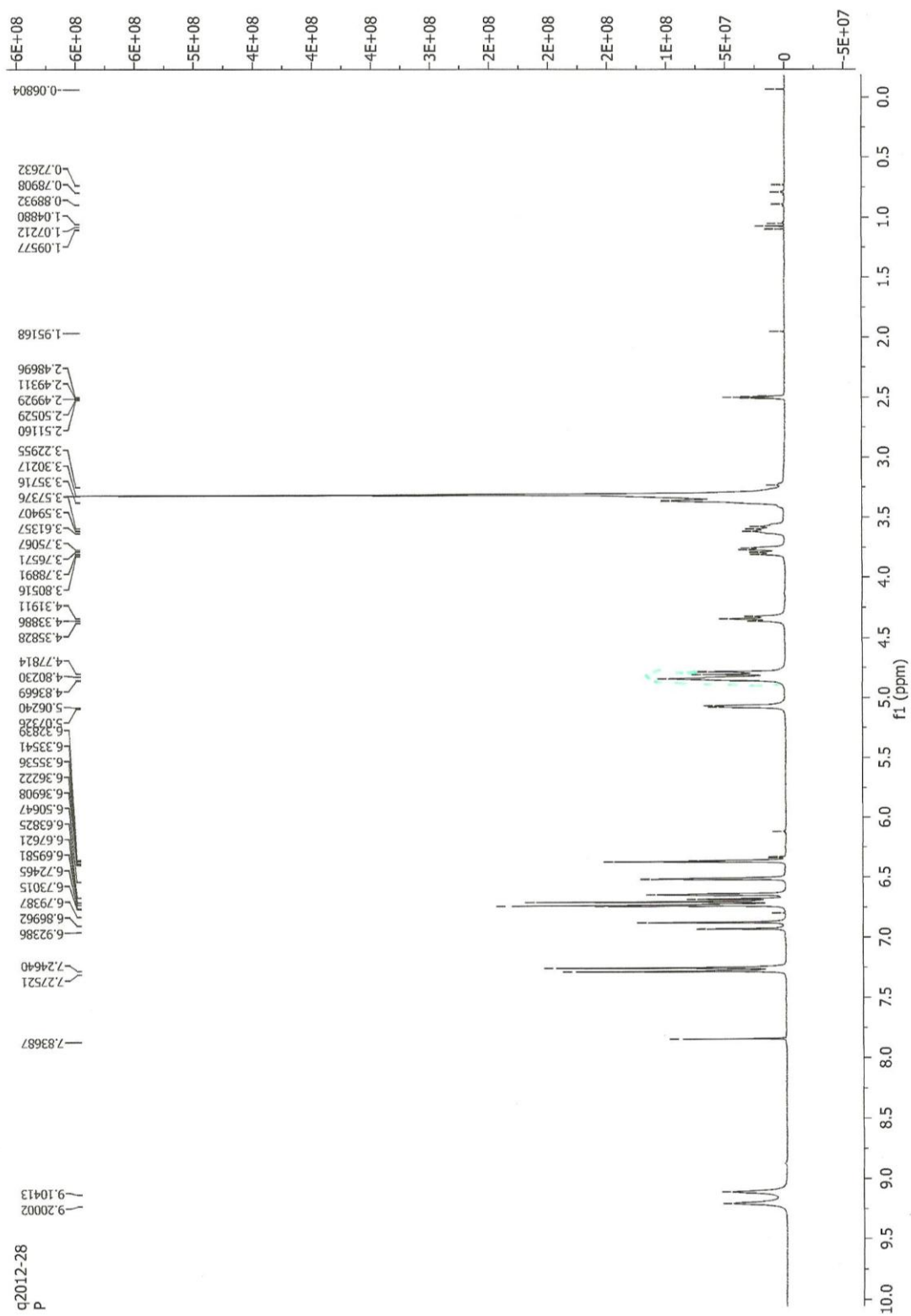
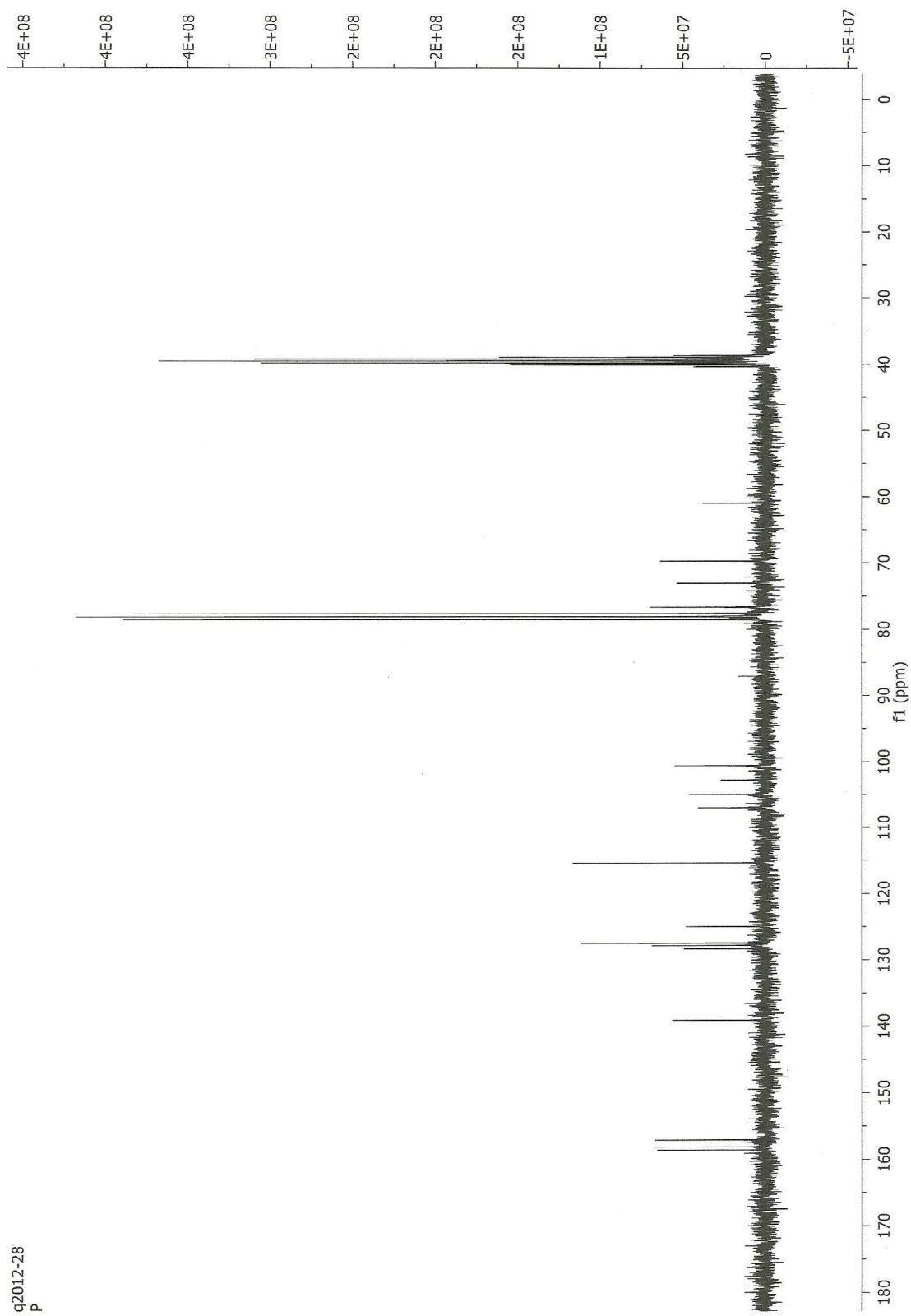


Figura 26 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina (composto 1).



**Figura 27** - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da polidatina (composto 1).

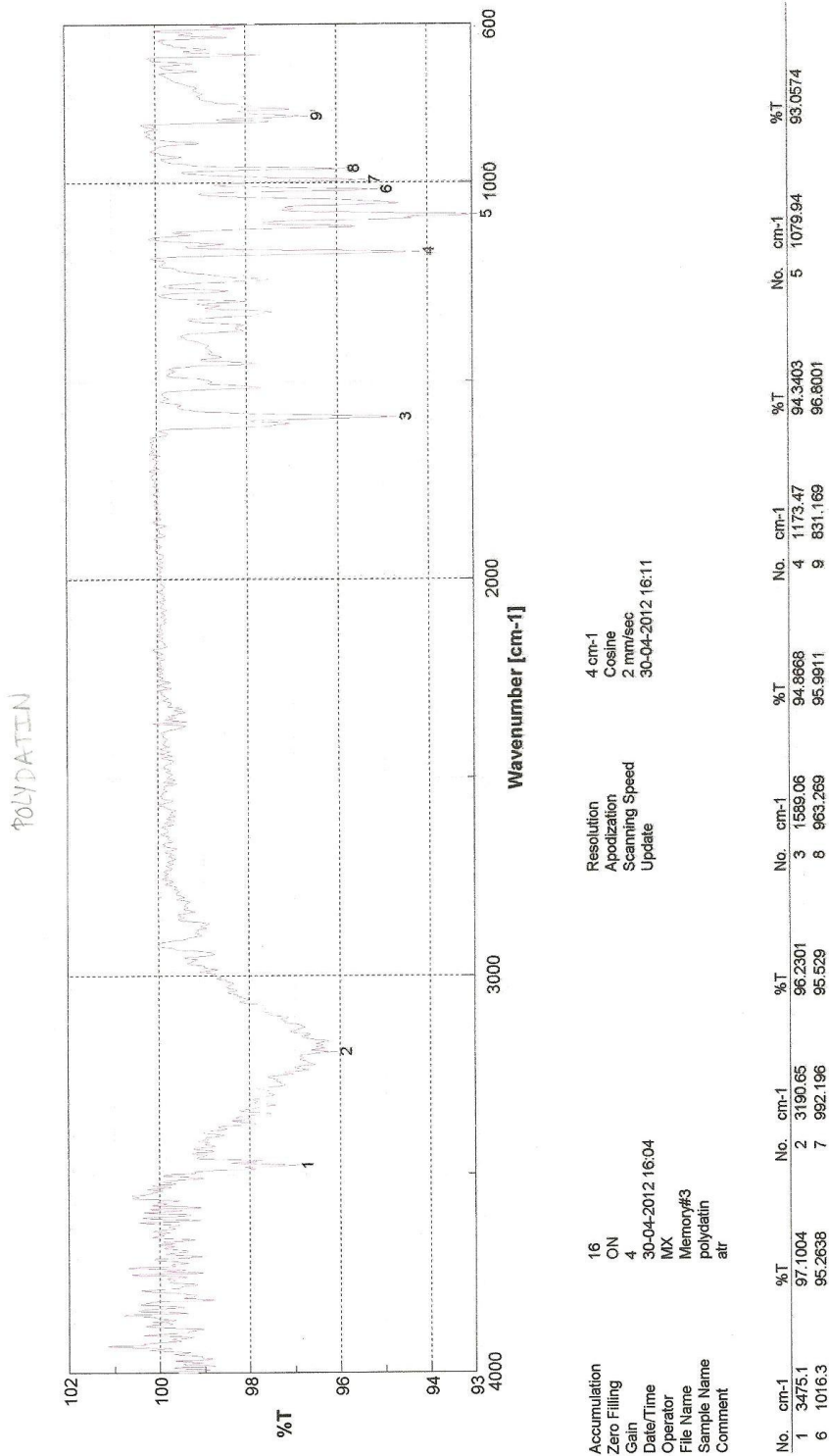


Figura 28 - Espectro IV da polidatina (composto 1).

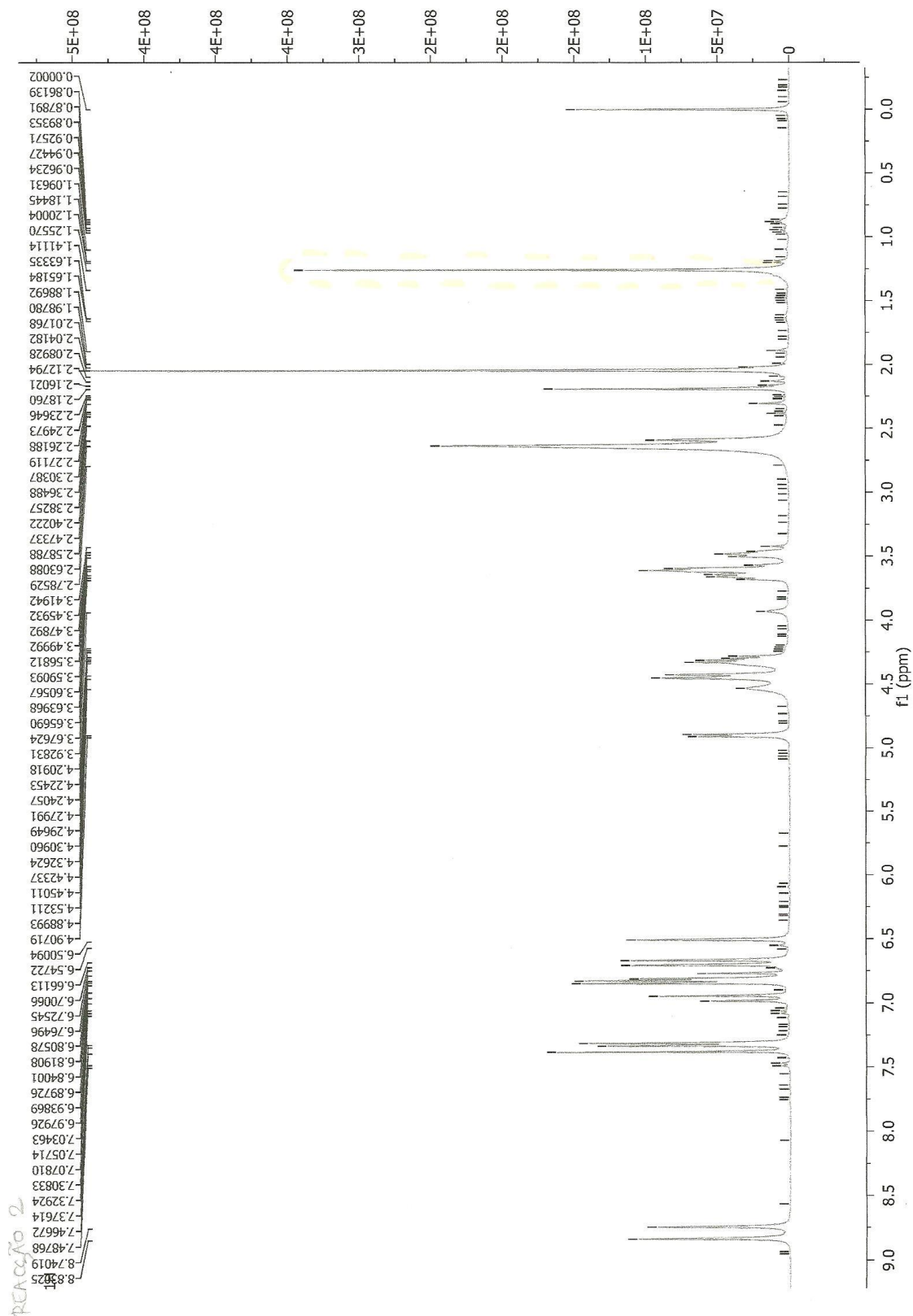
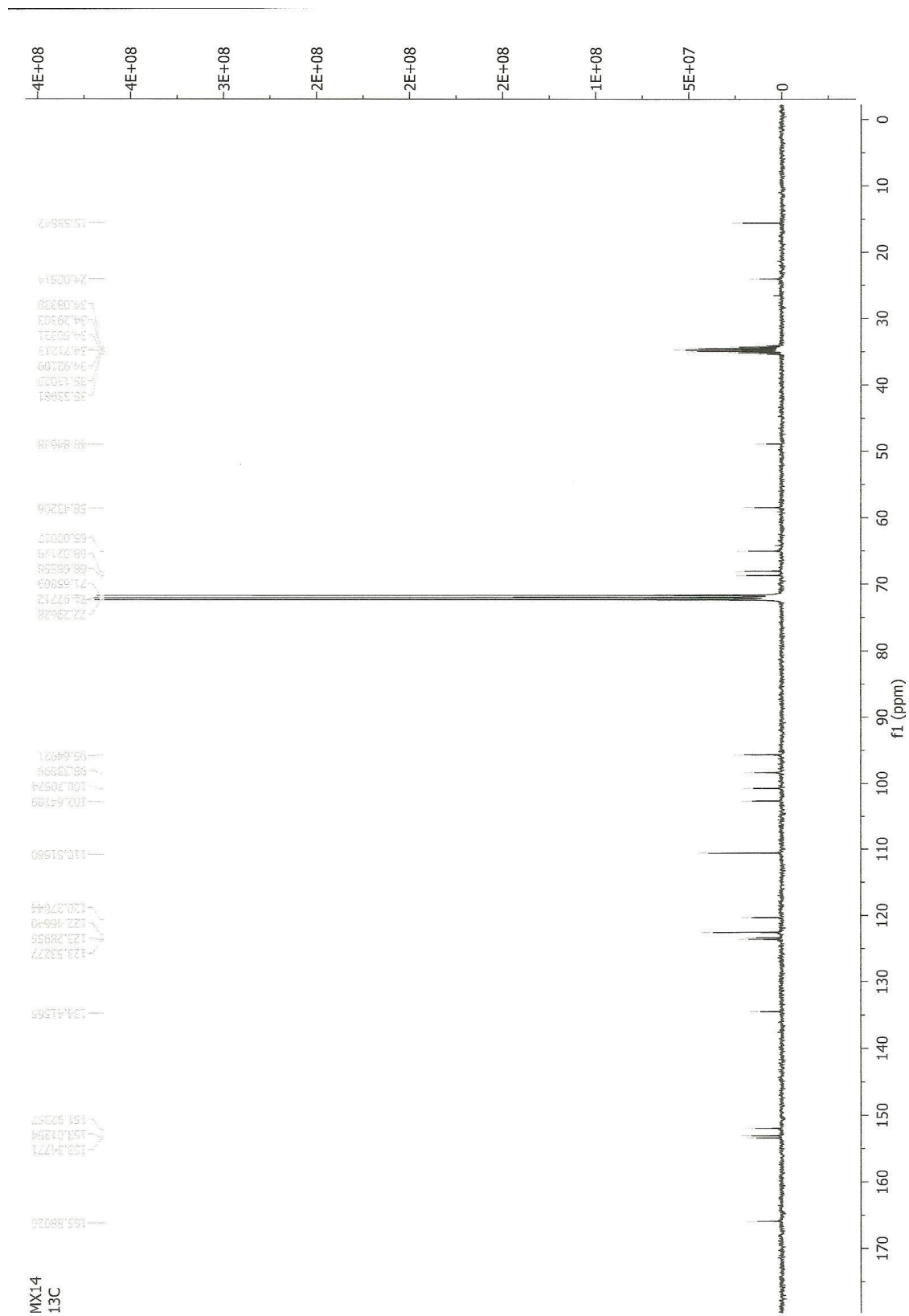


Figura 29 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina 6''-monoacetato (produto 2a).





**Figura 30** - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da polidatina 6''-monoacetato (produto **2a**).

REACÇÃO 2

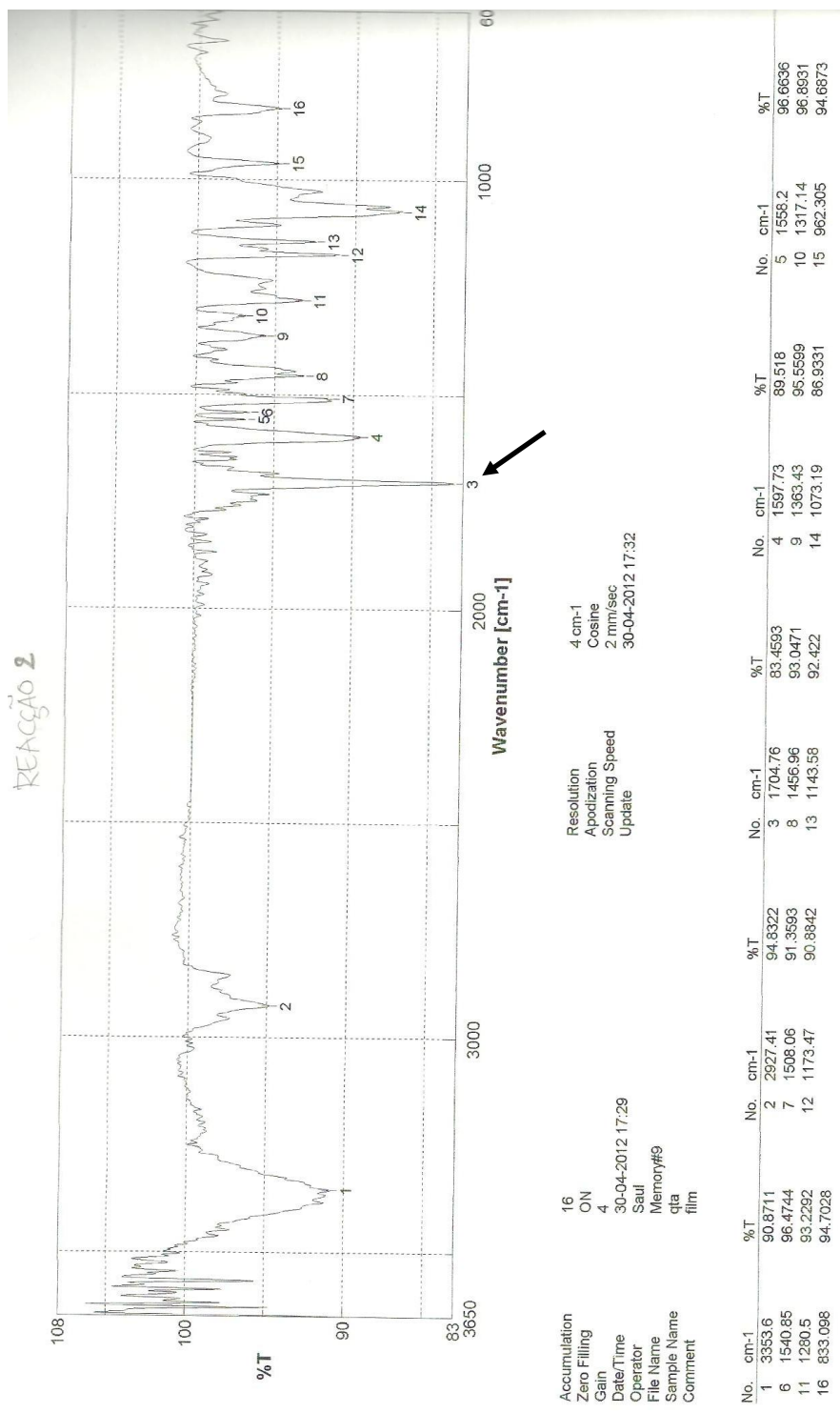
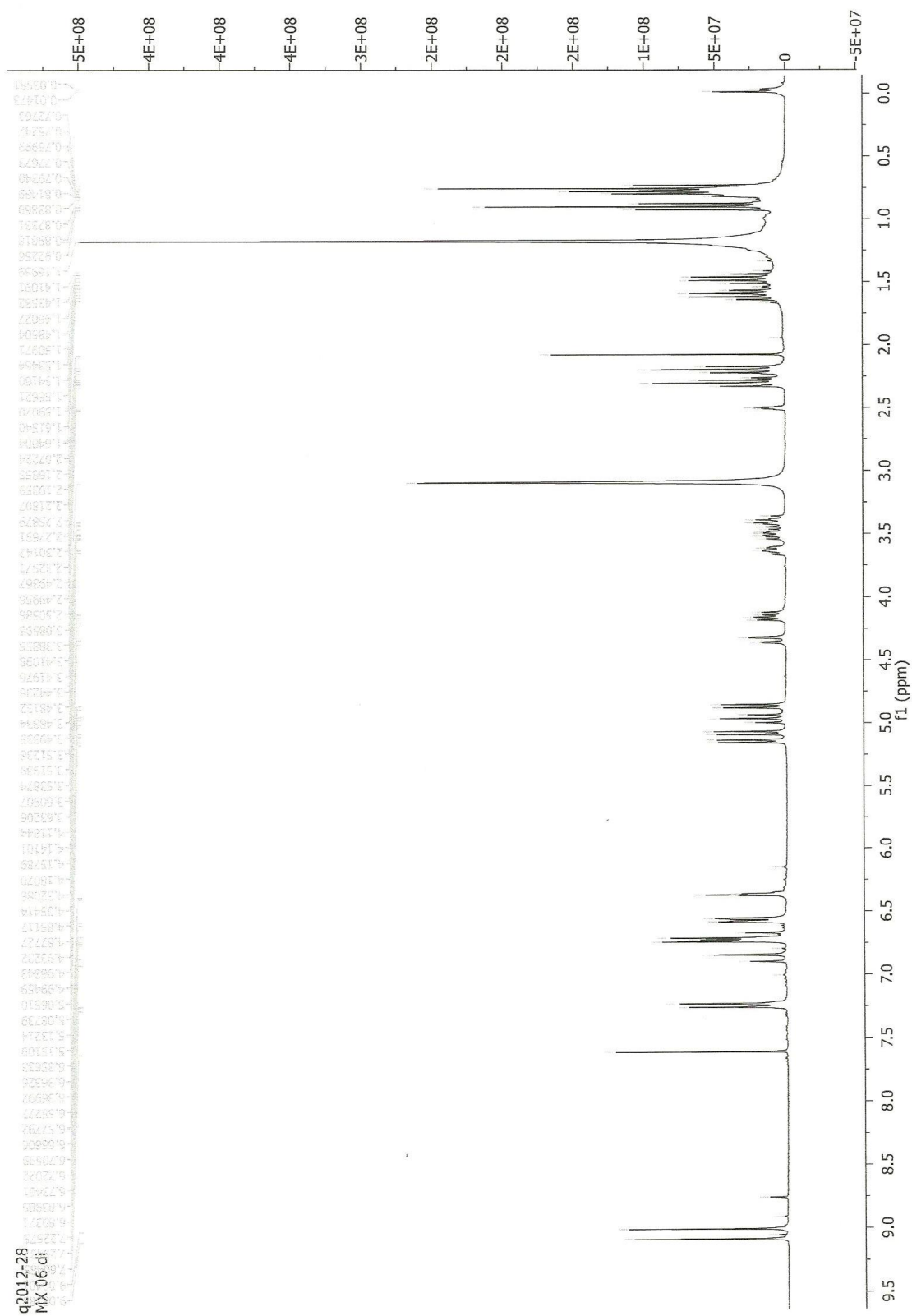


Figura 31 - Espectro IV da polidatina 6''-monoacetato (produto 2a) com indicação do grupo carbonilo.



**Figura 32** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto **7a**).

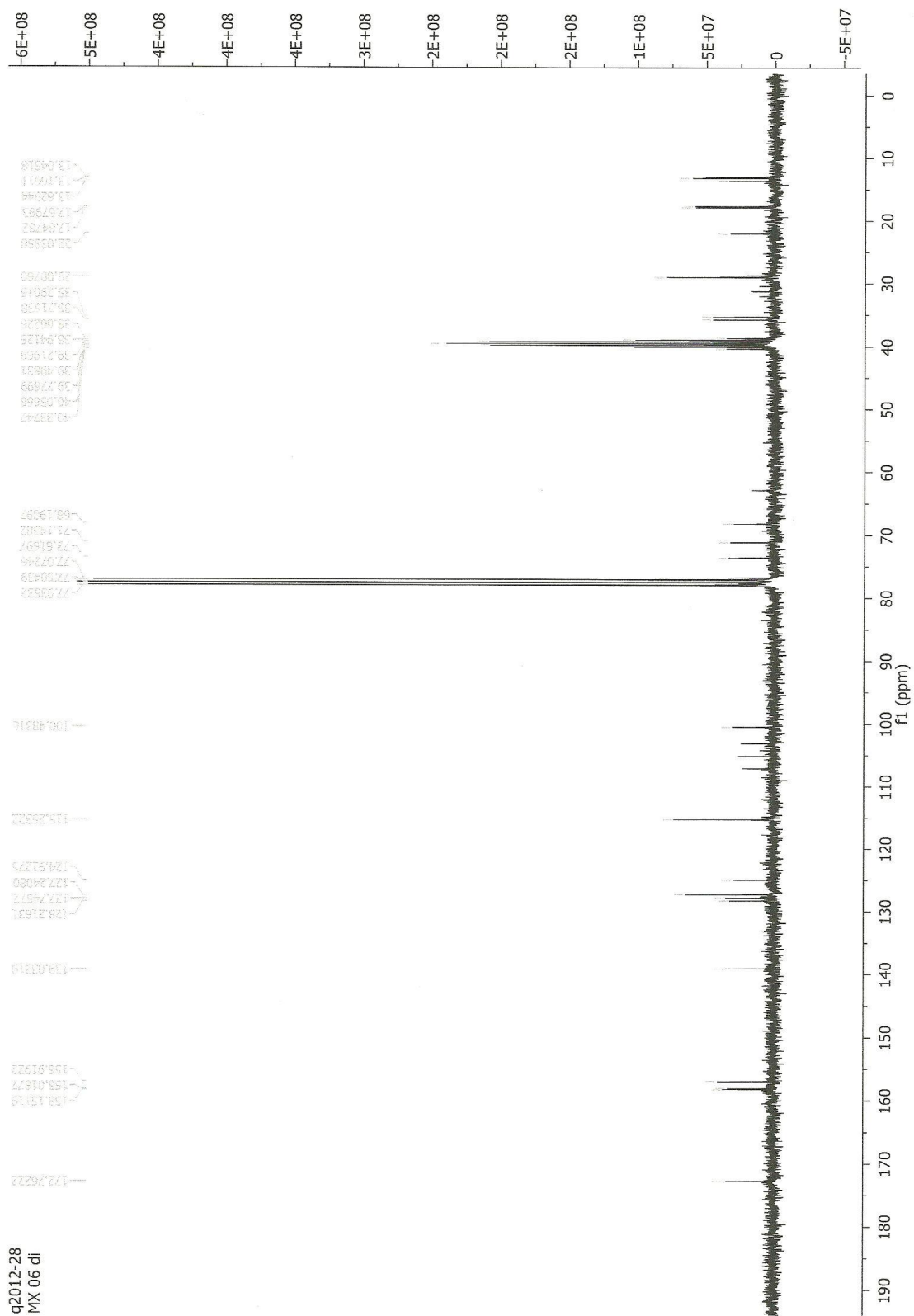
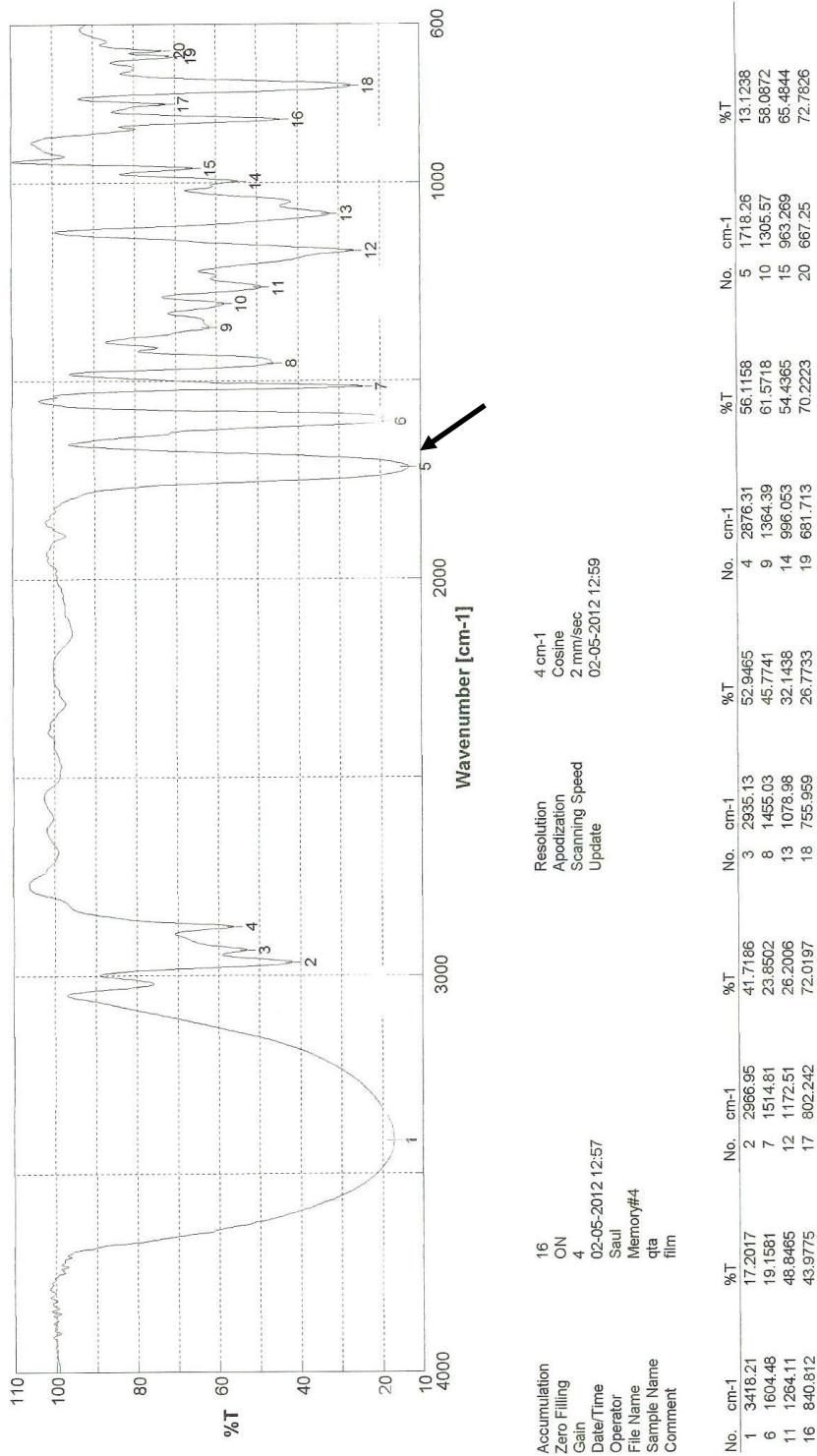


Figura 33 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto 7a).



**Figura 34** - Espectro IV da polidatina 2'',6''-dibutirato (produto **7a**) com indicação do grupo carbonilo.