



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Joana Rita Pinto Velho

ESTUDO DAS REAÇÕES DE ACILAÇÃO REGIOSSELETIVA  
DA POLIDATINA SOB CATÁLISE ENZIMÁTICA

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

Setembro de 2018

Joana Rita Pinto Velho

Estudo das reações de acilação regioseletiva da polidatina sob  
catálise enzimática

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

Setembro, 2018





## Agradecimentos

Este pequeno espaço foi reservado para lembrar todos aqueles que de uma forma mais profunda ou sublime, contribuiriam para a realização deste trabalho, que me orientaram, ensinaram e apoiaram em todos os momentos.

Assim, não posso deixar de agradecer ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, Orientador deste trabalho, pela oportunidade de realização do mesmo, ensinamentos e disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva, Orientadora deste trabalho, expresso a minha gratidão pela sua ajuda preciosa, sabedoria, receptividade, dedicação, preocupação, orientação crítica e sugestiva, incentivo, ensinamentos e disponibilidade sem os quais não seria possível efetuar este trabalho.

Gostaria de agradecer à Dona Graça Santiago pelo apoio, simpatia e disponibilidade demonstrada ao longo deste trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus familiares e amigos mais próximos, que sempre me acompanharam ao longo das etapas importantes da minha vida, com uma palavra de encorajamento e um sorriso de reconhecimento. Aos meus pais, em particular, que sempre me deram asas para voar e sempre me apoiaram em tudo. Ao longo do meu percurso académico, foi sem dúvida neles que encontrei os conselhos, a calma e o discernimento para enfrentar os momentos mais difíceis. A eles devo tudo o que sou hoje.



## Abreviaturas

AMPK - proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

CALB - lipase B de *Candida antarctica*

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

CoA - coenzima A

COX - ciclo-oxigenase

ECM - matriz extracelular

eNos - NOS endotelial

ER - recetor de estrogénio

FAD<sup>+</sup> - flavina-adenina dinucleótido oxidado

FMD - dilatação mediada por fluxo

GLUT4 - transportador de glucose tipo 4

HBD - beta defensina

HDL - lipoproteína de alta densidade

HX-XOD - hipoxantina-xantina oxidase

IC50 - metade da concentração inibitória máxima

IL - interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase

LDL - lipoproteína de baixa densidade

log P - logaritmo de coeficiente de partição

mg - miligrama

mg / g - miligrama por grama

mg / L - miligrama por litro

min - minuto

mL - mililitro

mmol / L - milimol por litro

NAD<sup>+</sup> - nicotinamida-adenina dinucleótido oxidada

NADP<sup>+</sup> - nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidada

NF-κB - factor nuclear kappa B

nm - nanómetro

NO - óxido nítrico

° C - graus Celcius

p.f. - ponto de fusão

PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E2

pH - potencial hidrogeniônico

pKa - constante de acidez

PPAR - recetores ativados por proliferador de peroxissoma

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN <sup>13</sup>C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN <sup>1</sup>H - ressonância magnética nuclear de próton

ROS - espécies reativas de oxigênio

rpm - rotações por minuto

Shh - Sonic Hedgehog

SIRT - sirtuína

TGF - fator de transformação do crescimento

TNF - fator de necrose tumoral

UV - ultravioleta

## Resumo

Os compostos polifenólicos são um grupo de metabolitos secundários que ocorrem na Natureza. São considerados compostos bioativos pois apresentam múltiplas propriedades biológicas e farmacológicas, entre elas destaca-se a atividade antioxidante. A sua aplicação é reduzida devido à sua baixa solubilidade em água, fraca absorção intestinal e estabilidade limitada. A polidatina é um derivado glicosilado do resveratrol com uma grande variedade de actividades biológicas descritas em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*.

A modificação semi-sintética dos compostos polifenólicos glicosilados através da obtenção de derivados acilados visa melhorar as características físico-químicas dos compostos e explorar a modulação das suas actividades biológicas.

A acilação enzimática seletiva destes compostos é preferível em relação à catálise química, uma vez que se trata de moléculas complexas e lábeis, sendo necessárias reações seletivas e condições suaves, condições estas não oferecidas pela catálise química. Além disso, por via enzimática, as etapas de proteção / desproteção dos grupos funcionais são evitadas, reduzindo os passos de síntese. Tendo em consideração as vantagens que oferece a biocatálise, esta parece ser uma estratégia eficaz para a modificação estrutural dos compostos polifenólicos.

De forma a melhorar as propriedades biológicas e farmacológicas da polidatina, um derivado glicosilado do resveratrol, este trabalho teve como objetivo geral a obtenção de derivados acilados da polidatina através da biocatálise, recorrendo à lipase B de *Candida antarctica* (CALB) como biocatalisador.

Neste trabalho estudou-se a síntese e caracterização estrutural de derivados acilados da polidatina, onde pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear foi possível verificar as posições de acilação da polidatina, bem como confirmar a estrutura dos derivados acilados obtidos.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos, Estilbenos, Polidatina, Acilação enzimática, CALB, Regiosseletividade.



## Abstract

Polyphenolic compounds are a group of secondary metabolites occurring in Nature. They are considered bioactive compounds because they have multiple biological and pharmacological properties, among them the antioxidant activity. Its application is reduced due to its low solubility in water, poor intestinal absorption and limited stability.

Recently, the scientific interest has turned to the acylated derivatives, in order to improve the physicochemical characteristics of the polyphenolic compounds. The selective enzymatic acylation of these compounds is preferred over chemo-catalysis. There are several reasons for this assertion, because as they are complex molecules, soft conditions are required, conditions not offered by chemical catalysis. In addition, enzymatically, the protection / deprotection steps of the functional groups are avoided, reducing the steps of synthesis. In view of the advantages of biocatalysis, this appears to be an effective method for the structural modification of the polyphenolic compounds in order to improve their properties.

In order to improve the biological and pharmacological properties of polydatin, this work had as general objective to obtain acylated derivatives of polydatin through biocatalysis, resorting to the lipase B of *Candida antarctica* (CALB) as biocatalyst.

This work consisted in the synthesis and characterization of the acylated derivatives of polydatin, where by the analysis of nuclear magnetic resonance spectra it was possible to determine the acylation positions of polydatin, as well as to confirm the structure of the acylated derivatives obtained.

**Keywords:** Phenolic compounds, Stilbenes, Polydatin, Enzymatic acylation, CALB, Regioselectivity.



# Índice

Capítulo I.....	1
I. Introdução .....	3
I.1. Compostos polifenólicos .....	3
I.1.1. Estilbenos.....	9
I.1.1.1. Resveratrol.....	13
I.1.1.2. Polidatina .....	21
I.2. Biocatálise: Princípios e Aplicações .....	29
I.2.1. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas como catalisadores.....	31
I.2.2. Classificação das enzimas.....	32
I.2.3. Mecanismo catalítico e aplicações das hidrolases .....	36
I.2.4. Biocatálise em meio orgânico .....	43
I.2.5. Biocatálise no âmbito da Química verde.....	46
I.2.6. Modulação da atividade biológica de compostos polifenólicos através de modificações estruturais.....	49
Capítulo II.....	55
2. Objetivos .....	57
Capítulo III.....	59
3. Parte Experimental .....	61
3.1. Instrumentação .....	61
3.2. Cromatografia .....	61
3.3. Reagentes e solventes .....	61
3.4. Acilação enzimática da polidatina.....	62
3.4.1. Síntese do 3'', 6''- diacetato de polidatina (Composto 2).....	62
3.4.2. Síntese de 6''- monocinamato de polidatina (Composto 3).....	62
3.4.3. Síntese de 3'', 6''- dipropionato de polidatina (Composto 4).....	62
3.4.4. Síntese de 6''- monopropionato de polidatina (Composto 5).....	63
3.4.5. Síntese de 6''- propionato, 3''- acetato de polidatina (Composto 6).....	63

Capítulo IV .....	65
4. Resultados e Discussão .....	67
4.1. Definição das condições de acilação da polidatina .....	67
4.2. Acilação enzimática da polidatina .....	68
Capítulo V .....	81
5. Conclusão .....	83
Capítulo VI .....	85
6. Referências Bibliográficas .....	87

# Índice de Ilustrações

## Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas da catequina e da quercetina.....	6
Figura 2 - As várias rotas de absorção previstas para os compostos fenólicos (adaptado de Soto-Hernández, 2017).....	8
Figura 3 - Estrutura dos estilbenos.....	10
Figura 4 - Biossíntese dos estilbenos (adaptado de Cichewicz & Kouzi, 2002; Roupe <i>et al.</i> , 2006).....	11
Figura 5 - Estrutura dos isómeros cis e trans do resveratrol.....	14
Figura 6 - Descrição dos efeitos biológicos do resveratrol e do vinho tinto (adaptado de Lippi <i>et al.</i> , 2010; Artero <i>et al.</i> , 2015.....	16
Figura 7 - Metabólitos do resveratrol (adaptado de Gambini <i>et al.</i> , 2015).....	20
Figura 8 - Estrutura química da polidatina.....	22
Figura 9 - Ilustração do diagrama de topologia da dobra canónica $\alpha$ / $\beta$ -hidrolase. (Adaptado de Gaber, 2012).....	37
Figura 10 - Mecanismo catalítico das serina-hidrolases.....	40
Figura 11 - Os doze princípios da química verde.....	47
Figura 12 - Estrutura química da polidatina, com identificação dos grupos hidroxilo primário, fenólicos e secundários, e posições de acilação. ....	69
Figura 13 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da polidatina.....	70
Figura 14 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da polidatina.....	70
Figura 15 - Espectro RMN $^1\text{H}$ do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o acetato de vinilo.....	71
Figura 16 - Espectro RMN $^{13}\text{C}$ do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com acetato de vinilo.....	72
Figura 17 - Reacção de diacilação da polidatina, utilizando acetato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.....	72
Figura 18 - Espectro RMN $^1\text{H}$ do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o cinamato de vinilo.....	73
Figura 19 - Espectro RMN $^{13}\text{C}$ do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com cinamato de vinilo.....	74
Figura 20 - Reacção de monoacilação da polidatina, utilizando cinamato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.....	74

Figura 21 - Espectro RMN <sup>1</sup> H do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.....	75
Figura 22 - Espectro RMN <sup>13</sup> C do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.....	76
Figura 23 - Reacção de diacilação da polidatina, utilizando propionato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador. ....	76
Figura 24 - Espectro RMN <sup>1</sup> H do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.....	77
Figura 25 - Espectro RMN <sup>13</sup> C do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.....	78
Figura 26 - Reacção de acilação da polidatina, utilizando propionato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador .....	78
Figura 27 - Espectro RMN <sup>1</sup> H do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o acetato de vinilo.....	79
Figura 28 - Espectro RMN <sup>13</sup> C do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o acetato de vinilo.....	80
Figura 29 - Reacção de acilação do derivado 6''- monopropionato da polidatina com inserção do acetato na posição 3'', utilizando acetato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.....	80

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais classes de compostos fenólicos em relação à sua cadeia de carbono (adaptado de Morales-Gonzales, 2013).....	4
Tabela 2 - Classe de enzimas e tipo de reacções que catalizam (Faber <i>et al.</i> , 2015) .....	35
Tabela 3 - Reacções catalisadas pelas lipases (adaptado de Castillo <i>et al.</i> , 2015) .....	38
Tabela 4 - Quadro síntese das reacções realizadas ao longo deste trabalho .....	64
Tabela 5 - Quadro Síntese da nova reacção realizada ao longo deste trabalho .....	64

# Capítulo I

## Introdução



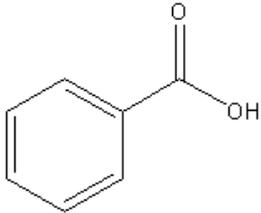
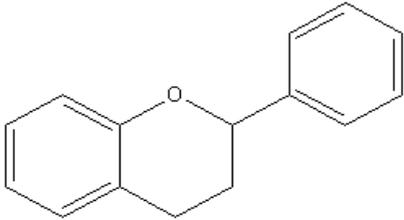
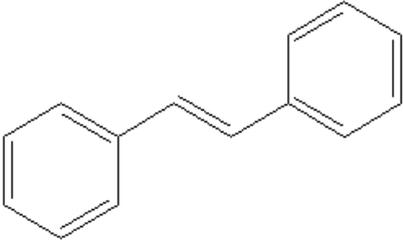
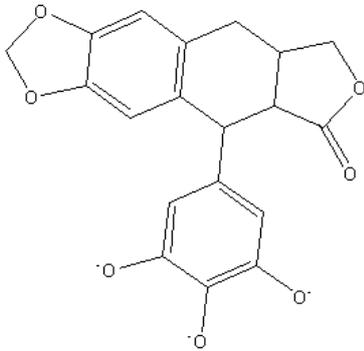
# I. Introdução

## I.1. Compostos polifenólicos

Os compostos polifenólicos são um grupo de metabolitos secundários que ocorrem na Natureza (Phan *et al.*, 2014; Bouayed, 2012) e, como tal, são encontrados em alimentos e bebidas derivados de plantas (Croft, 2016). Estes compostos são produzidos como resposta de defesa por parte das plantas contra agentes patogénicos e o *stress* em geral, sendo essenciais para o crescimento e reprodução das plantas (Bouayed, 2012).

Os polifenóis caracterizam-se por possuírem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupos hidroxilo. As suas estruturas podem variar de moléculas fenólicas simples até compostos altamente polimerizados, de elevado peso molecular (Bouayed, 2012; Ozcan *et al.*, 2014; Croft *et al.*, 2016). São classificados de acordo com a natureza do seu esqueleto de carbono: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas (Tabela 1) (Phan *et al.*, 2014). Entre as várias classes de compostos fenólicos, os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos são considerados os principais compostos fenólicos encontrados na dieta humana (Soto-Hernández, 2017; Bouayed, 2012).

Tabela 1 - Principais classes de compostos fenólicos em relação à sua cadeia de carbono (adaptado de Morales-Gonzales, 2013).

Classe	Esqueleto	Estrutura básica
Ácidos fenólicos	$C_6 - C_1$	
Flavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$	
Estilbenos	$C_6 - C_2 - C_6$	
Lignananas	$(C_6 - C_3)_2$	

A biossíntese dos compostos polifenólicos ocorre por duas vias metabólicas: a via do ácido chiquímico, onde são formados, principalmente, os fenilpropanóides e a via do ácido acético, em que os principais produtos formados são os fenóis simples. A maioria dos compostos fenólicos são sintetizados através da via dos fenilpropanóides (Morales-Gonzales, 2013).

Os metabolitos secundários conferem funções adaptativas à planta, nomeadamente de defesa (contra predadores e microrganismos), de atração (polinização de insetos e aves), adaptativas (*stress* hídrico e radiação UV) e de alelopatia (inibem o crescimento de espécies competitivas) (Gutzeit & Muller, 2014).

Até ao momento foram identificados mais de 8000 compostos polifenólicos naturais em plantas e alimentos vegetais, como legumes, frutas e cereais (Mussatto, 2015). A maioria dos polifenóis que ocorrem naturalmente estão presentes como conjugados com mono e polissacáridos, ligados a um ou mais grupos fenólicos. Além disso, podem ocorrer como derivados funcionais tais como ésteres e ésteres metílicos (Balasundram, *et al.*, 2006; Soto-Hernández, 2017).

Diversos fatores podem influenciar a quantidade e a qualidade dos polifenóis presentes nos alimentos, entre eles a genética da planta e o seu modo de colheita, a composição do solo e as condições de crescimento, o estado de maturidade da planta e, por fim, as condições pós-colheita destes metabolitos secundários (Ozcan *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, as frutas e os vegetais apresentaram um interesse nutricional crescente, dependendo do tipo, número e modo de ação dos diferentes componentes, designados de "fitoquímicos", pelos quais são constituídos estes alimentos. As plantas são fontes ricas em micronutrientes alimentares funcionais, fibras e fitoquímicos, como o ácido ascórbico, os carotenóides e os compostos fenólicos, que, individualmente ou em combinação, podem ser benéficos para a saúde (Ozcan *et al.*, 2014). Os compostos polifenólicos receberam atenção considerável devido à crescente evidência que sugere que o seu consumo promove numerosos benefícios para a saúde humana. Esta evidência baseia-se em estudos que indicam uma associação entre a ingestão de polifenóis e a sua ação protetora contra diversas doenças (Mussatto, 2015).

Aliás, alguns estudos têm demonstrado que uma dieta rica em frutas e legumes contribui para retardar o envelhecimento e diminuir o *stress* oxidativo associado a doenças crónicas como, por exemplo, distúrbios da função cognitiva e doenças neurológicas (Soto-Hernández, 2017; Lanzilli *et al.*, 2011).

A ampla gama de efeitos biológicos, fisiológicos e farmacológicos dos polifenóis está associada, principalmente, à sua ação antioxidante, prevenindo diversas doenças que envolvem o *stress* oxidativo, como aterosclerose, cancro, doenças neurodegenerativas (como, por exemplo, doença de parkinson e doença de Alzheimer) e processos associados ao envelhecimento (Phan *et al.*, 2014, Mussatto, 2015). Esta atividade é exercida através da eliminação de radicais livres, da quelação e estabilização de catiões divalentes e através da modulação de enzimas endógenas antioxidantes (Ozcan *et al.*, 2014; Vlachogianni *et al.*, 2015; Soto-Hernández, 2017).

É de notar que a atividade antioxidante dos polifenóis depende do estado de hidroxilação dos seus anéis aromáticos, ou seja, depende do número e da posição dos grupos hidroxilo nos anéis aromáticos (Vlachogianni *et al.*, 2015; Ozcan *et al.*, 2014; Bouayed, 2012). Há algumas características estruturais que têm sido associadas à atividade antioxidante dos polifenóis. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilo adjacentes, localizados nas várias posições dos anéis A, B e C, as ligações duplas do anel benzeno e a ligação dupla do grupo funcional 4-oxo (- C = O) de alguns polifenóis, fornecem a estes compostos elevada atividade antioxidante (Soto-Hernández, 2017; Bouayed, 2012; Croft *et al.*, 2016).

Esta característica pode ser observada na quercetina e na catequina (Figura 1). Ambos os compostos compartilham um número semelhante de grupos hidroxilo, nas mesmas posições, no entanto, a quercetina contém ainda uma ligação dupla C2-C3 no anel C e no grupo funcional 4-oxo. A vantagem desta estrutura é o aumento da atividade antioxidante, quando comparada com a estrutura da catequina com aproximadamente metade da atividade antioxidante (Soto-Hernández, 2017).

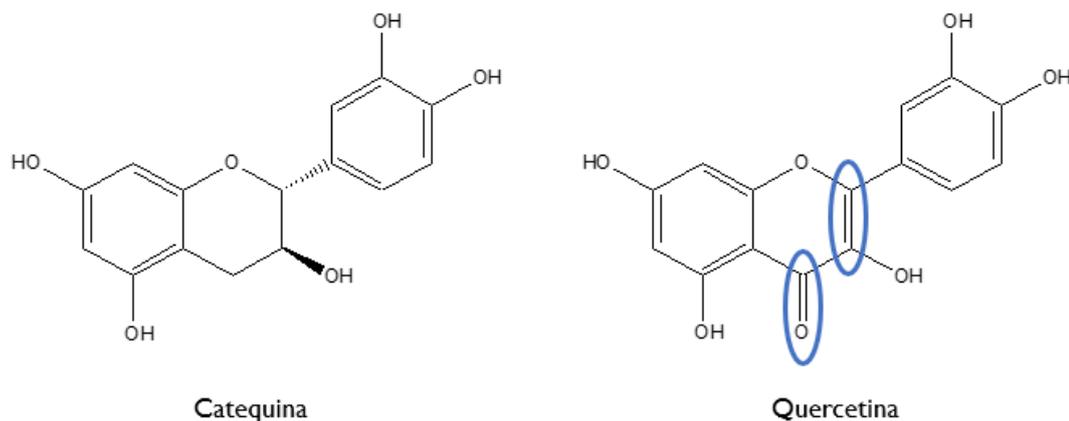


Figura 1 - Estruturas da catequina e da quercetina.

Além da atividade antioxidante, estes compostos exibem efeitos anti-inflamatórios, efeitos antimicrobianos (potencial para inibir o crescimento de vários microrganismos, bem como o vírus HIV e influenza), efeitos antitumorais (potencial para inibir a tumorigenese em vários órgãos, incluindo pulmão, estômago, esôfago, intestino delgado, cólon, pâncreas, fígado, próstata e pele), efeitos antitrombóticos (potencial para inibir a agregação de plaquetas), efeitos antihiperlipidêmicos e antidiabéticos. É também de notar, a ação benéfica dos polifenóis no sistema cardiovascular, uma vez que inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade que estão associadas à formação de placas ateroscleróticas (Mussatto, 2015).

A biodisponibilidade e o metabolismo dos polifenóis devem ser ponderados quando se consideram os possíveis benefícios destes compostos para a saúde humana (Croft, 2016). Apesar de vários estudos comprovarem que muitos polifenóis possuem propriedades bioquímicas potencialmente úteis, oferecendo uma promessa para o combate de diversas doenças, o seu uso é limitado devido à sua baixa solubilidade em água, estabilidade limitada e fraca absorção intestinal, sendo pouco absorvidos e, por consequência, estão presentes na circulação sanguínea em quantidades muito baixas (Le *et al.*, 2017; Biasutto *et al.*, 2009). A fraca absorção intestinal deve-se ao facto dos polifenóis apresentarem uma estrutura hidrofóbica (Acerson & Andrus, 2014; Torres *et al.*, 2011). É de notar que solubilidade é reconhecida como um fator chave para a biodisponibilidade (Biasutto *et al.*, 2009).

Portanto, os possíveis benefícios dos polifenóis para a saúde dependem da sua absorção e metabolismo (Ozcan *et al.*, 2014; Balasundram *et al.*, 2006). Estas duas etapas ocorrem em vários pontos durante a passagem pela parede do intestino delgado para o sistema circulatório e posterior transporte pela veia porta para o fígado (Balasundram *et al.*, 2006).

Na Natureza, os polifenóis ocorrem principalmente como derivados glicosilados (Biasutto *et al.*, 2009). Estes compostos necessitam de ser convertidos nas suas agliconas, na parede intestinal, antes de serem absorvidos para a circulação sanguínea (Torres *et al.*, 2011; Biasutto *et al.*, 2009). Após a absorção, as agliconas dos polifenóis são conjugadas com glucuronato ou sulfato (Soto-Hernández, 2017; Torres *et al.*, 2011). Dependendo do grau de glicosilação, os polifenóis e os seus metabolitos podem permanecer mais ou menos tempo a nível da circulação sanguínea. Isto deve-se ao facto da hidrólise completa dos diferentes compostos glicosilados, no trato intestinal, depender do padrão de glicosilação dos compostos bioativos (Torres *et al.*, 2011).

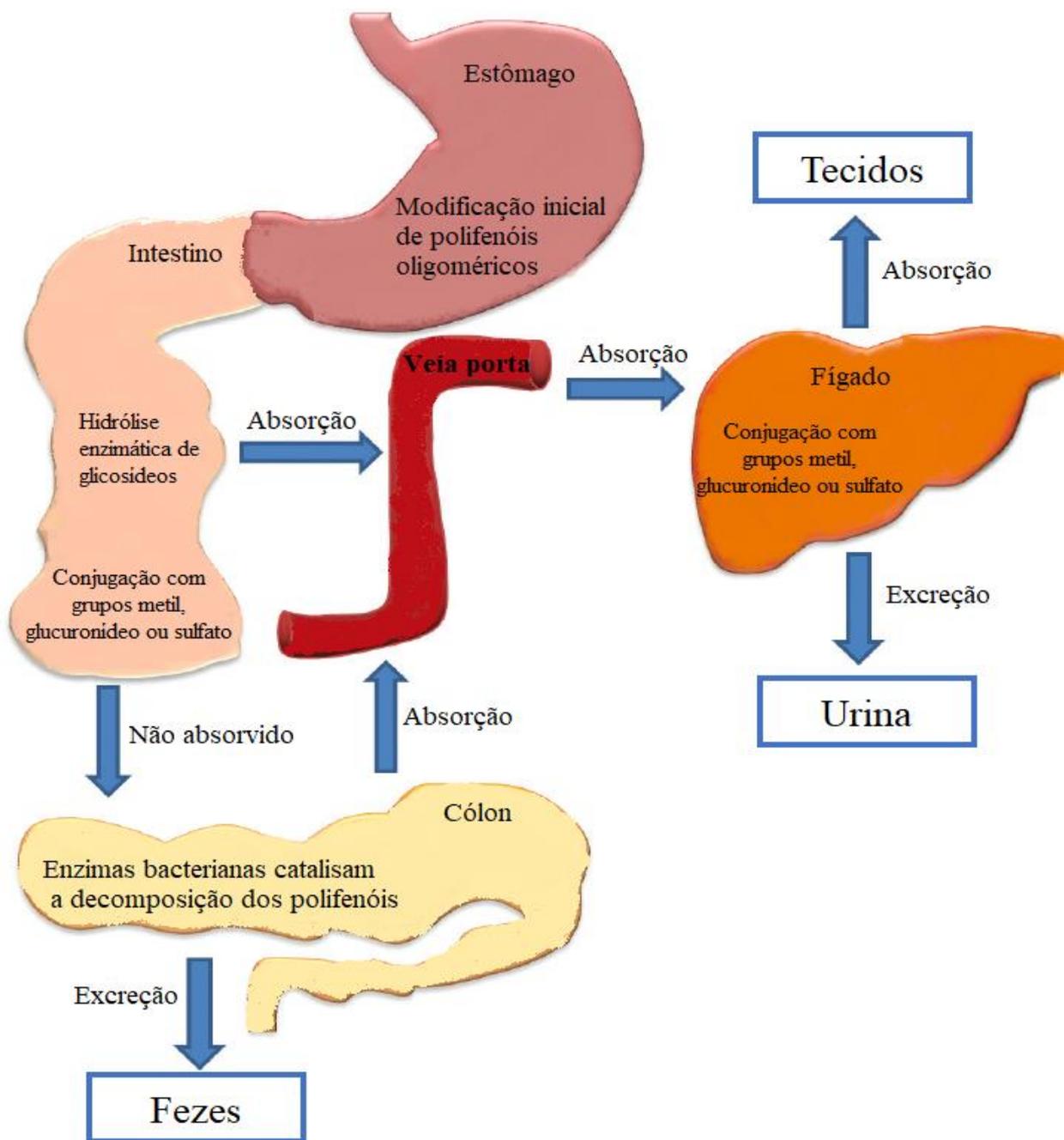


Figura 2 - As várias rotas de absorção previstas para os compostos fenólicos (adaptado de Soto-Hernández, 2017).

A absorção e o metabolismo dos polifenóis são, então determinados pela sua estrutura, o que inclui o grau de glicosilação/acilação, o tamanho molecular e a solubilidade (Ozcan, *et al.*, 2014; Balasundram *et al.*, 2006). A glicosilação de compostos bioativos é conhecida por melhorar a sua biodisponibilidade. Por exemplo, a solubilidade do resveratrol aumenta significativamente, de 5 a 18 vezes, quando uma molécula de glicose é adicionada, de forma a originar a polidatina (Le *et al.*, 2017).

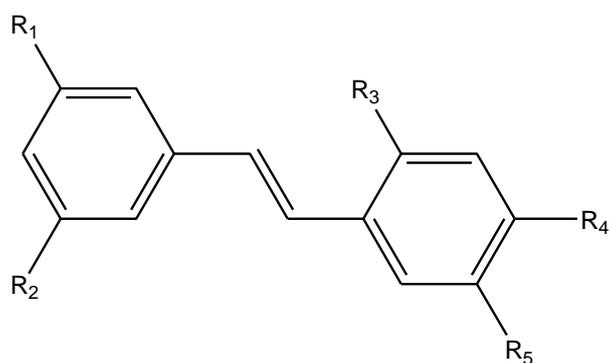
A glicosilação, além de melhorar as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos, tais como a solubilidade e o coeficiente de partição, protege contra a oxidação por grupos fenólicos que se encontram glicosilados e melhora a biodisponibilidade dos medicamentos que necessitam de passar a barreira hematoencefálica (Torres *et al.*, 2011). A biodisponibilidade pode ser melhorada através da otimização da escolha do componente glicosídico ou por ligação a uma molécula polimérica solúvel (Biassuto *et al.*, 2009).

Desvendar a importância destes polifenóis e estabelecer relações estrutura-atividade abre caminho para que estes compostos bioativos possam ser possíveis candidatos a medicamentos funcionais (Phan *et al.*, 2014).

### 1.1.1. Estilbenos

Os estilbenos representam uma classe única de produtos naturais biologicamente ativos, produzidos por várias famílias de plantas (Le, *et al.*, 2017; Mathew *et al.*, 2012). São pequenos compostos de baixo peso molecular (Sugathan *et al.*, 2017; Roupe *et al.*, 2006) e estruturalmente caracterizados por um esqueleto de catorze carbonos, com dois anéis fenilo unidos por uma ponte de etileno (Cichewicz *et al.*, 2002; Kasiotis *et al.*, 2013; Rivière *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2008). Assim, são designados por compostos 1,2-difeniletileno, estando os grupos hidroxilo que os constituem, substituídos nos anéis fenilo (Ozcan *et al.*, 2014). Apresentam uma fórmula básica C6-C2-C6 e são divididos em duas categorias: estilbenos monoméricos e estilbenos oligoméricos (Kuate, 2013; Kiselev *et al.*, 2016).

Embora os polifenóis apresentem uma enorme diversidade química, os estilbenos constituem um grupo restrito de moléculas, cujo esqueleto é baseado no resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno), na pinosilvina (3,5-di-hidroxi-*trans*-estilbeno), ou do piceatannol (3,4,3',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno) que são os principais precursores da biossíntese dos estilbenos e os mais comuns encontrados nas plantas (Jeandet *et al.*, 2010; Kiselev *et al.*, 2016).



<b>ESTILBENO</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
<b>RESVERATROL</b>	OH	OH	H	OH	H
<b>PINOSILVINA</b>	OH	OH	H	H	H
<b>PICEATANNOL</b>	OH	OH	H	OH	OH

Figura 3 - Estrutura dos estilbenos.

Nas plantas, os estilbenos parecem funcionar como fitoalexinas, as quais são reconhecidas como importantes moléculas nos mecanismos de defesa das plantas contra microrganismos fitopatogénicos, sendo sintetizadas em resposta a uma ampla gama de fatores de *stress* bióticos e abióticos (Kuo, Chen & Liu, 2016; Jeandet *et al.*, 2010; Roupe *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2014; Kiselev *et al.*, 2016). Sob ameaça ambiental, o hospedeiro vegetal ativa a via dos fenilpropanóides e os estilbenos são produzidos (Roupe *et al.*, 2006). Por exemplo, os seus papéis como compostos de defesa antifúngicos foram demonstrados em plantas como a *Vitis vinifera* (videira) (Wiese *et al.*, 1994), a *Sorghum bicolor* (sorgo) (Yu *et al.*, 2005) e a *Arachis hypogaea* (amendoim) (Sobolev *et al.*, 2008).

Estes compostos ocorrem naturalmente em várias famílias de plantas não relacionadas incluindo Ericaceae (mirtilos), Pinaceae (pinhas), Poaceae (sorgos), Polygonaceae (ruibarbo), Fabaceae (amendoim), Gnetaceae (gnetum) e Vitaceae (uvas) (Kiselev *et al.*, 2016; Jeandet *et al.*, 2010; Reinisalo *et al.*, 2015; Rivière *et al.*, 2012), mas apenas alguns deles são encontrados na dieta humana, incluindo a *trans*-resveratrol e o seu glicósido natural, a *trans*-polidatina (Kasiotis *et al.*, 2013). As principais fontes de estilbenos incluem uvas, vinho, soja e amendoim (Ozcan, *et al.*, 2014). As uvas constituem a principal fonte de estilbenoides na dieta humana (Sugathan *et al.*, 2017; Mathew *et al.*, 2012).

Os estilbenos são sintetizados através da via dos fenilpropanóides (Kiselev *et al.*, 2016). A síntese destes compostos é dependente de uma única enzima chave conhecida como estilbeno sintase (Cichewicz & Kouzi, 2002; Reinisalo *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014;

Rivière *et al.*, 2012). A estilbeno sintase não é expressa em todas as espécies de plantas e, portanto, a distribuição dos estilbenos no reino vegetal é limitada (Rivière *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2005). Esta enzima não é expressa constitutivamente nas plantas. É expressa em resposta a fatores de *stress*, que incluem, entre outros, radiação ultravioleta, estímulos químicos e ataques microbianos. Estes fatores são capazes de iniciar a síntese desta enzima, facilitando o aumento desta na planta (Cichewicz & Kouzi, 2002; Yu *et al.*, 2005).

O esqueleto de um estilbeno é formado através da condensação de três moléculas de malonil-CoA e de uma molécula de p-coumaroil-CoA (no caso do resveratrol) ou de uma molécula de cinamoil-CoA (no caso da pinosilvina) (Cichewicz & Kouzi, 2002; Jeandet *et al.*, 2010; Kiselev *et al.*, 2016; Rivière *et al.*, 2012). O fecho do anel, de forma a originar o estilbeno, é conseguido por uma condensação aldólica intramolecular, acoplada à perda de CO<sub>2</sub> (Figura 4) (Hammerbacher, 2011).

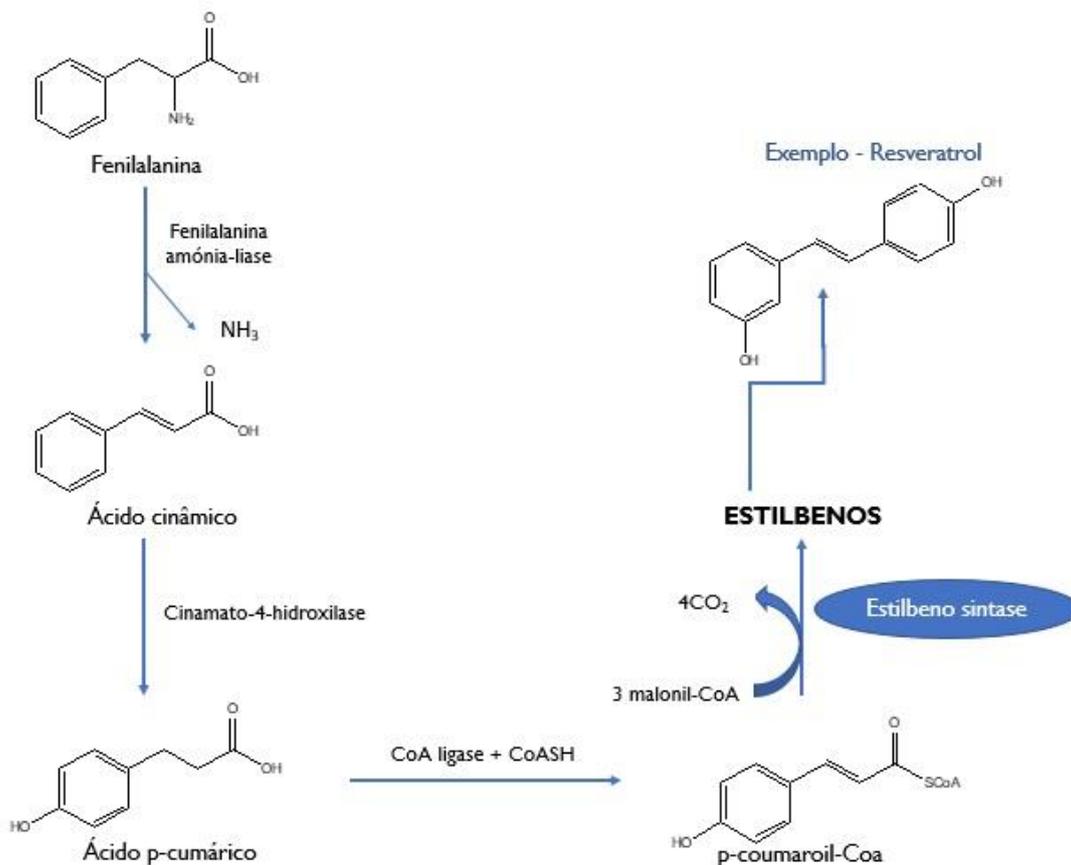


Figura 4 - Biossíntese dos estilbenos (adaptado de Cichewicz & Kouzi, 2002; Roupe *et al.*, 2006).

Como resultado da ponte de eteno que une os dois anéis aromáticos destes compostos, os estilbenos podem ocorrer como dois possíveis estereoisômeros, a forma E (*trans*-estilbeno) e a forma Z (*cis*-estilbeno), dependendo de onde os grupos funcionais estão ligados em relação um ao outro em ambos os lados da ligação dupla (Likhtenshtein, 2010; Ünsalan *et al.*, 2015, Roupe *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014). É de notar que devido à sua estrutura planar e ao seu impedimento estérico, o *cis*-estilbeno é, portanto, menos estável (Likhtenshtein, 2010; Ünsalan *et al.*, 2015; Kiselev *et al.*, 2016). Têm sido descritos vários caminhos que levam à isomerização do estilbeno *trans* para *cis*, tais como a quebra da dupla ligação por radicais, foto-isomerização direta sob irradiação solar ou ultravioleta e isomerização térmica (Silva *et al.*, 2014).

O isômero *trans* é a configuração mais comum e a forma mais abundante nas plantas, sendo conhecido por apresentar propriedades biológicas mais ativas em comparação com o isômero *cis* (Kiselev *et al.*, 2016; Roupe *et al.*, 2006; Sugathan *et al.*, 2017; Rivière *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014). Aliás foi demonstrado em vários ensaios que a forma Z exibe atividade anticancerígena e antioxidante mais forte em comparação com a forma E (Roupe *et al.*, 2006). Waffo-Tégou *et al.* (2001) mostraram que os compostos *trans*-estilbeno são significativamente mais potentes na sua capacidade de inibir a atividade da ciclo-oxigenase (COX) I em comparação com os compostos *cis*-estilbeno (Waffo-Tégou *et al.*, 2001).

Muitos papéis têm sido atribuídos aos estilbenos, como compostos antimicrobianos, dissuasores ou repelentes nas plantas, protegendo-as de ataques por fungos, bactérias, ou herbívoros (Jeandet *et al.*, 2010). Mais recentemente, os estilbenos foram reconhecidos pelos seus efeitos protetores em várias patologias principalmente pela sua atividade antioxidante, anticancerígena, cardioprotetora e neuroprotetora (Kuate, 2013; Mathew *et al.*, 2012; Jeandet *et al.*, 2010).

Como um composto fenólico, os estilbenos contribuem para o potencial antioxidante do vinho tinto, que pode estar relacionado com a diminuição de doenças cardiovasculares observada entre os consumidores de vinho (Torres *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos do vinho podem ser divididos em flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides representam mais de 85 % dos componentes fenólicos do vinho tinto. Os compostos incluem ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, estilbenos e taninos hidrolisáveis. A proporção de compostos fenólicos no vinho depende da variedade da uva, da região, do método de produção e do processo de envelhecimento. O vinho tinto é conhecido por conter 10 vezes mais compostos fenólicos do que o vinho branco (Artero *et al.*, 2015; Lippi *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade limitada, a baixa especificidade do alvo e o rápido metabolismo dos estilbenos representam obstáculos para alcançar concentrações suficientemente altas destes compostos no plasma e nos tecidos-alvo, a fim de exercer os seus efeitos benéficos (Reinisalo *et al.*, 2015). A glicosilação dos estilbenos é funcional para o armazenamento, translocação, modulação da atividade antifúngica e proteção contra a degradação oxidativa (Flamini *et al.*, 2013). É de salientar que a glicosilação do *trans*-estilbeno reduz a sua atividade quando comparado com as agliconas correspondentes, o que é menos importante na estrutura do isómero Z (Ramawat & Merillon, 2008).

Os estilbenos compreendem uma classe de polifenóis vegetais que ganharam grande interesse pelas suas estruturas intrínsecas e pelas suas diversas atividades biológicas. Estes compostos e os seus derivados são de interesse notável para áreas como a biotecnologia da saúde, pesquisa e desenvolvimento de medicamentos e medicina, devido ao seu potencial em aplicações terapêuticas ou preventivas (Silva *et al.*, 2014). Pode-se considerar que os estilbenos emergem como ferramentas promissoras contra as duas maiores ameaças à saúde na nossa sociedade: doenças cardiovasculares e cancro (Kasiotis *et al.*, 2013).

#### 1.1.1.1. Resveratrol

Entre os estilbenos, o resveratrol, 3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno, é o estilbeno mais estudado (Le *et al.*, 2017). Foi originalmente isolado a partir da raiz seca *Veratrum grandiflorum* em 1940 (Artero *et al.*, 2015; Fuggetta & Mattivi, 2011; Sebastia *et al.*, 2012) e é constituído por dois anéis aromáticos unidos por uma ligação dupla “estilbénica” (Udenigwe *et al.*, 2008; Fuggetta & Mattivi, 2011; Artero *et al.*, 2015; Zamora-Ros *et al.*, 2008; Rizvi & Pandey, 2010). Os anéis aromáticos que o constituem possuem três grupos hidroxilo ligados aos seus átomos de carbono, como observado na maioria dos compostos polifenólicos (Udenigwe *et al.*, 2008).

A dupla ligação que une os dois anéis aromáticos do resveratrol permite que este ocorra naturalmente na forma isomérica *cis* - (Z) e *trans* - (E), *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol (Figura 5), sendo o isómero *trans* do resveratrol estereoquimicamente a forma mais estável e mais comumente usada (Camont *et al.*, 2009; Artero *et al.*, 2015; Fuggetta & Mattivi, 2011; Sebastia *et al.*, 2012; Udenigwe *et al.*, 2008; Huang & Mazza, 2011; Đekić *et al.*, 2008; Cvejic *et al.*, 2010). Além disso, é de salientar que a forma E e a forma Z do resveratrol têm efeitos biológicos diferentes, pois foi relatado que o isómero *trans* é

biologicamente mais ativo, exibindo atividade antioxidante mais forte que o isômero *cis* (Huang & Mazza, 2011; Kasiotis *et al.*, 2013).

Ambos os isômeros *trans* e *cis* do resveratrol existem na forma dos seus glicósidos (Udenigwe *et al.*, 2008). O *cis*-resveratrol pode ser obtido através do *trans*-resveratrol, sob exposição à luz solar ou irradiação UV em comprimentos de onda de 254 nm ou 366 nm. (Camont *et al.*, 2009; Huang & Mazza, 2011; Artero *et al.*, 2015; Fuggetta & Mattivi, 2011; Sebastia *et al.*, 2012; Kiselev *et al.*, 2016; Likhtenshtein, 2010).

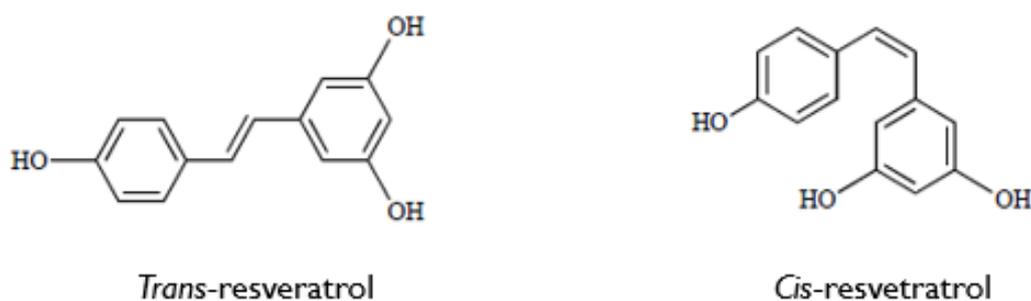


Figura 5 - Estrutura dos isômeros *cis* e *trans* do resveratrol.

Nas plantas, os polifenóis são geralmente encontrados como glicósidos ou metóxidos, ou ligados a cadeias de ácidos gordos (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). O resveratrol também pode ser encontrado na Natureza como um glicósido (Torres *et al.*, 2011). Estes derivados diferem das agliconas não apenas nas suas atividades biológicas (principalmente antioxidante), mas também na sua solubilidade em água e biodisponibilidade (Kuhnle *et al.*, 2000; Orsini *et al.*, 1997).

Curiosamente, a maioria dos polifenóis não são substituídos no seu grupo hidroxilo "reduzidor", isto é, podem ainda funcionar como antioxidantes, mas podem também estar expostos a enzimas oxidantes e patogênicas (Arora *et al.*, 1998; Pannala *et al.*, 2001). Uma vez formados, os polifenóis são submetidos a oxidação deletéria pelas próprias enzimas oxidantes (por exemplo, tirosinases) da planta (Espín & Wichers, 1999, Gilly *et al.*, 2001). Além disso, tais enzimas, que neutralizam as atividades biológicas dos polifenóis, também são excretadas por patógenos vegetais e existem em todo o sistema digestivo (Regev-Shoshani *et al.*, 2003) O *trans*-resveratrol, como outros polifenóis, é submetido à oxidação enzimática por estas enzimas nas plantas, durante o processamento de alimentos e também após o consumo humano (Espín & Wichers, 1999, Gilly *et al.*, 2001).

Regev-Shoshani *et al.* (2003) mostraram que substituir o grupo hidroxilo na posição C-4' (para) do resveratrol bloqueou completamente a sua oxidação enzimática pelas tirosinases. Sugere-se que a glicosilação do resveratrol, e possivelmente outros polifenóis, nos seus grupos menos reativos tenham evoluído nas plantas de modo a proteger estas moléculas da oxidação enzimática, enquanto mantém as suas atividades benéficas e aumenta a sua solubilidade e biodisponibilidade (Regev-Shoshani *et al.*, 2003).

O resveratrol é um dos muitos metabolitos secundários produzidos pelas plantas que pode contribuir para os potenciais benefícios para a saúde atribuídos a algumas plantas (Huang & Mazza, 2011). É considerado uma fitoalexina produzido naturalmente por várias famílias de plantas, mais notavelmente na casca de uva, contra infeções fúngicas ou bacterianas e fatores bióticos e abióticos (Kapetanovic *et al.*, 2011; Fuggetta & Mattivi *et al.*, 2011; Stivala *et al.*, 2001; Sebastià *et al.*, 2012; Likhtenshtein *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016b; Kasiotis *et al.*, 2013; Udenigwe *et al.*, 2008; Huang & Mazza, 2011; Lippi *et al.*, 2010; Camont *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2010; Ruhman *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2011). Pode-se considerar que as propriedades fitoalexínicas do resveratrol em plantas podem explicar a bioatividade associada a esta molécula (Udenigwe *et al.*, 2008).

A principal enzima responsável pela biossíntese do resveratrol é a estilbeno-sintase que condensa uma molécula de p-cumaroil CoA com três moléculas de malonil-CoA (Figura 4) (Park *et al.*, 2015; Udenigwe *et al.*, 2008; Sebastià *et al.*, 2012). Os genes codificadores da estilbeno-sintase foram identificados na videira, no pinheiro, na *Arachis hypogea*, no *Parthenocissus henryana*, na *Vitis riparia*, no sorgo, entre outras (Park *et al.*, 2015).

O resveratrol é um componente característico da *Vitis vinífera*, estando presente principalmente na casca de uvas e, portanto, é um constituinte do vinho tinto (Zamora-Ros, *et al.*, 2008; Likhtenshtein *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016b). Todavia, o resveratrol não é exclusivo da *Vitis vinífera* pois este é encontrado em muitos alimentos e bebidas à base de plantas, incluindo amendoins, amoras, mirtilo, cacau em pó, leguminosas e em outros alimentos que tem sido usado há séculos na medicina tradicional asiática (Kapetanovic *et al.*, 2011; Artero *et al.*, 2015; Stivala *et al.*, 2001; Rizvi & Pandey, 2010; Kasiotis *et al.*, 2013; Sebastià *et al.*, 2012; Udenigwe *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2016).

O resveratrol parece desempenhar um papel ativo na prevenção do desenvolvimento e progressão da doença cardiovascular, possivelmente por meio de um caleidoscópio de efeitos benéficos (Figura 6) (Lippi *et al.*, 2010; Artero *et al.*, 2015).

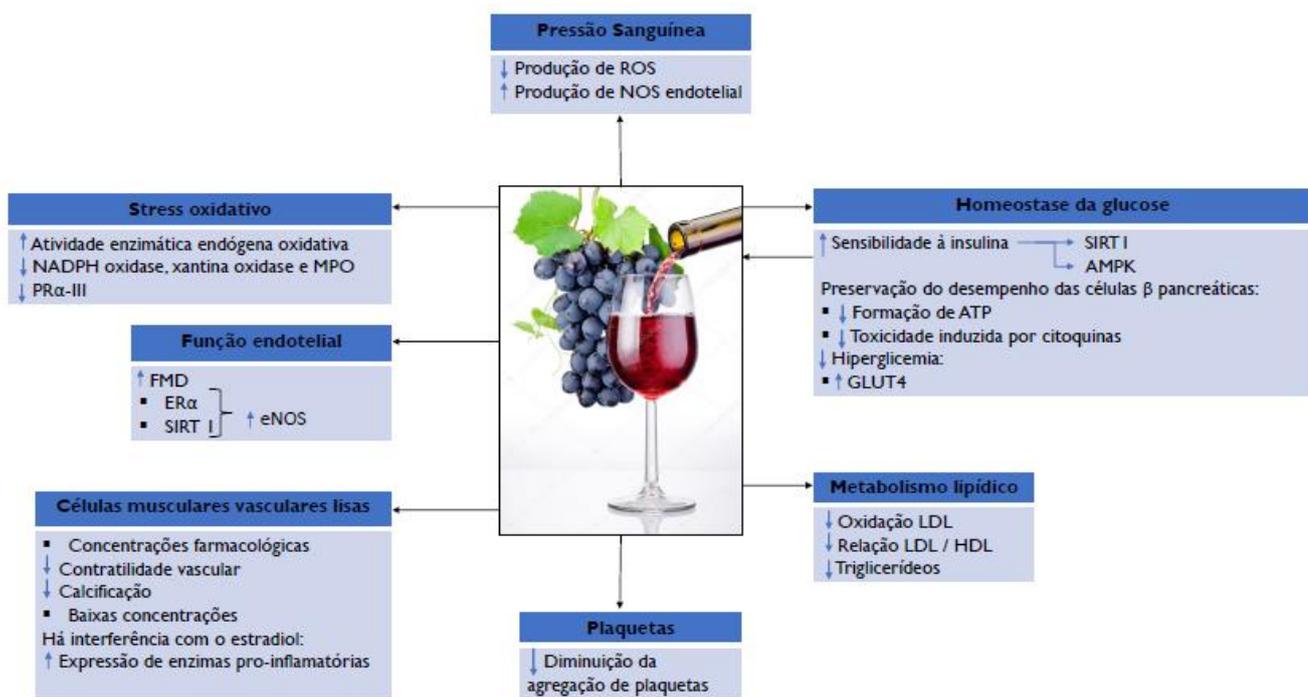


Figura 6 - Descrição dos efeitos biológicos do resveratrol e do vinho tinto (adaptado de Lippi et al., 2010; Artero et al., 2015).

A função fisiológica do resveratrol foi identificada pela primeira vez num estudo epidemiológico da Organização Mundial de Saúde, que mostrou que, embora os franceses tenham ingestão relativamente alta de gorduras, a incidência de doenças cardiovasculares foi significativamente menor do que em outras nacionalidades. O efeito foi relacionado com a ingestão relativamente alta de vinho tinto pelos franceses (Renaud & De Lorgeril, 1992). Investigações posteriores mostraram que o resveratrol era o principal composto que exercia um efeito protetor contra doenças cardiovasculares (Siemann & Creasy, 1992).

A proporção de compostos fenólicos no vinho depende da variedade da uva, da região de cultivo, do método de produção e do processo de envelhecimento. Os compostos fenólicos do vinho podem ser divididos em flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides, que representam mais de 85 % dos componentes fenólicos do vinho tinto, incluem diferentes famílias moleculares, como flavonóis, flavonas e antocianidinas. Os compostos não flavonóides incluem ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, estilbenos (principalmente o resveratrol) e os taninos hidrolisáveis. O vinho tinto é conhecido por conter 10 vezes mais compostos fenólicos do que o vinho (Artero et al., 2015; Tedesco et al., 2000; Sebastià et al., 2012; Lippi et al., 2010; Likhtenshtein et al., 2010; Cvejic et al., 2010; Zamora-Ros et al., 2008).

O teor de polifenóis, incluindo o do resveratrol, no vinho tinto é naturalmente superior ao do vinho branco. O resveratrol é libertado da pele da uva durante a produção comercial de vinho. A baixa concentração de resveratrol no vinho branco deve-se às condições de processamento, ou seja, o vinho branco é fermentado após a remoção da pele da uva, enquanto que o vinho tinto é fermentado com a casca da uva, o que permite a absorção do resveratrol no vinho (Udenigwe *et al.*, 2008; Tedesco *et al.*, 2000; Lippi *et al.*, 2010; Đekić *et al.*, 2008; Cvejic *et al.*, 2010). O vinho tinto contém uma média de 2 mg / L de resveratrol enquanto que a concentração de resveratrol no vinho branco é  $\leq 1$  mg / L (Đekić *et al.*, 2008; Cvejic *et al.*, 2010).

Em relação à estrutura *trans* e *cis* do resveratrol no vinho, ambas as formas isoméricas estão presentes no vinho branco e no vinho tinto, sendo o isómero *cis* encontrado em quantidades relativamente menores do que o isómero *trans* (Udenigwe *et al.*, 2008; Đekić *et al.*, 2008; Cvejic *et al.*, 2010). No vinho tinto, a concentração do isómero *trans*, que é a forma principal, varia, geralmente, entre 0,10 e 15 mg / L (Đekić *et al.*, 2008).

O estudo epidemiológico que relaciona a baixa incidência de doenças cardiovasculares da população francesa, apesar da sua dieta rica em gorduras saturadas, com o consumo diário de quantidades moderadas de vinhos tinto e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, é chamado de “paradoxo francês”, sendo o fator chave deste paradoxo, a poderosa atividade antioxidante do resveratrol (Kasiotis *et al.*, 2013; Stojanovic & Brede 2002; Likhtenshtein *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015; Livingston *et al.*, 2015; Lippi *et al.*, 2010; Fernández-Pachón *et al.*, 2004; Cvejic *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2016).

Dentro do sistema cardiovascular, o eritrócito é o tipo mais comum de células sanguíneas. Estes são ricos em hemoglobina e ácidos gordos, sendo portanto, vulneráveis ao stress oxidativo. O stress oxidativo, por sua vez, pode levar à destruição estrutural e funcional dos eritrócitos, podendo estar relacionado ao risco de doença cardiovascular (Wang *et al.*, 2016b; Clemens & Waller, 1987). Rizvi & Pandey (2010) mostraram que o resveratrol pode penetrar os eritrócitos humanos e acumular-se em concentrações muito mais altas em comparação com os níveis plasmáticos (Rizvi & Pandey, 2010).

Wang *et al.* (2016b) criaram um modelo *in vitro* de dano oxidativo dos eritrócitos induzido pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase (HX-XOD), que simulou a principal via para a geração de radicais livres no corpo humano. Os radicais livres gerados pelo sistema HX-XOD podem promover a conversão de hemoglobina em meta-hemoglobina e causar a destruição da morfologia e função dos eritrócitos. O resveratrol exerceu efeitos protetores

na medida em que manteve a integridade estrutural e morfológica dos eritrócitos e além disso, inibiu a geração de meta-hemoglobina. Assim, ficou demonstrado o papel do resveratrol sobre os eritrócitos, sendo este benéfico para a saúde cardiovascular (Wang *et al.*, 2016 b).

O resveratrol demonstrou estar envolvido na modulação de inúmeras vias de sinalização celular (Karikumar *et al.*, 2008; Athar *et al.*, 2009), exercendo assim uma variedade de efeitos, entre eles, efeitos antioxidantes (Pan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Akarca *et al.*, 2017), anti-inflamatórios (Zhu *et al.*, 2011; Mattison *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017), antivirais (Zhao *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2017), antifúngicos (Houillé *et al.*, 2014), anticancerígenos (Kim *et al.*, 2017; Jing *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2013), cardioprotetores (Wang *et al.*, 2016b; Yan *et al.*, 2018; Riba *et al.*, 2017), neuroprotetores (Akarca *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2017), imunomoduladores (Zou *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2018), entre outros. Além destes efeitos, o resveratrol também desempenha um papel importante na diabetes (Yan *et al.*, 2018; Yang & Kang, 2018), na artrite (Wahba *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2016) e no envelhecimento (Li *et al.*, 2017).

O número e a posição dos grupos hidroxilo na molécula do resveratrol, assim como o número e a posição dos grupos hidroxilo glicosilados são importantes em termos de atividade antioxidante (Regev-Shoshani *et al.*, 2003; Stivala *et al.*, 2001; Stojanovic & Brede 2002; Fuggetta & Mattivi, 2011). Curiosamente, a maioria dos polifenóis que ocorre naturalmente são glicosilados nas posições menos reativas, em termos de capacidade antioxidante (Regev-shashomi *et al.*, 2003).

Foi descrito que o grupo hidroxilo na posição 4' é o grupo funcional mais reativo na eliminação de radicais livres e portanto, responsável pela atividade antioxidante do resveratrol (Regev-Shoshani *et al.*, 2003; Stivala *et al.*, 2001; Fuggetta & Mattivi, 2011). Por outras palavras, o grupo para-hidroxilo do resveratrol é mais reativo na eliminação de radicais livres do que o grupo meta-hidroxilo (Stojanovic & Brede 2002; Fang *et al.*, 2002). A observação de que os compostos *trans*-estilbeno que têm funcionalidades orto-di-hidroxilo e / ou para-hidroxilo possuem uma atividade antioxidante notavelmente mais elevada do que os que não possuem tais funcionalidades, fornece informação útil para a produção de fármacos antioxidantes (Fang *et al.*, 2002).

Portanto, ficou bem estabelecido que o grupo para-4-hidroxilo no resveratrol é mais ácido que os dois grupos meta-hidroxilo e, portanto, quaisquer características químicas ou

biológicas que modifiquem a acidez do resveratrol provavelmente aumentarão a sua atividade (Rizvi & Pandey, 2010).

Embora o resveratrol apresente efeitos benéficos em estudos *in vitro*, sabe-se que a sua distribuição a nível tecidual é muito baixa (Gambini *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2008). De facto, as suas potenciais atividades biológicas *in vivo* dependem da sua absorção intestinal e subsequente acesso aos tecidos alvo (Henry-Vitrac *et al.*, 2006). Apesar desta desvantagem do resveratrol, este mostra eficácia *in vivo*. Sabe-se que os polifenóis e os seus glicósidos são submetidos ao metabolismo enzimático e microbiano no trato gastrointestinal e no fígado, resultando na ocorrência de metabolitos glucunorados, metilados e sulfatados no plasma circulante (Regev-shoshani *et al.*, 2003; Henry-Vitrac, *et al.*, 2006).

O efeito *in vivo* do resveratrol pode ser explicado pela conversão dos seus metabolitos novamente em resveratrol nos órgãos-alvo como o fígado (Vitrac *et al.*, 2003). Ou seja, os metabolitos glucunorídeos podem sofrer clivagem enzimática pela enzima  $\beta$ -glucuronidase, dando-se a reabsorção do composto original. Outra possível explicação seria a recirculação entero-hepática dos metabólitos do resveratrol, seguida da sua desconjugação no intestino delgado e a sua reabsorção (Marier *et al.*, 2002; Kapetanovic *et al.*, 2011). Por fim, o efeito biológico do resveratrol *in vivo* poderá depender do efeito dos seus metabolitos circulantes (Gambini *et al.*, 2015; Zamora-Ros *et al.*, 2008). De facto, as concentrações séricas dos metabolitos sulfatados são mais altas do que as concentrações séricas de resveratrol. Portanto a capacidade dos metabolitos em reter algum grau de atividade pode ser relevante (Ogas *et al.*, 2013).

Assim, embora o resveratrol seja muito promissor, apresenta algumas limitações devido à sua fraca solubilidade, baixa estabilidade em meios aquosos e também pela sua propensão para oxidar. Estas propriedades fazem do resveratrol um composto com baixa biodisponibilidade (Marel *et al.*, 2008; Colin *et al.*, 2009).

O resveratrol é conhecido por apresentar baixa biodisponibilidade oral com alta absorção, mas metabolismo rápido e baixas concentrações teciduais (Ogas *et al.*, 2013; Kapetanovic *et al.*, 2011; Marel *et al.*, 2008; Colin *et al.*, 2009). Como um composto polifenólico ( $\log P > 3.1$ ), a permeabilidade gastrointestinal do resveratrol através das células epiteliais não é considerada uma preocupação (Das *et al.*, 2008). Aliás Walle *et al.* (2004) mostraram que quando administrada uma dose oral de 25 mg de resveratrol, em seres humanos, 70 % do resveratrol é absorvido (Walle *et al.*, 2004).

A biodisponibilidade do resveratrol fica então comprometida pelo seu metabolismo extenso, uma vez que, embora 70 % do resveratrol seja rapidamente absorvido após ingestão oral, são detetadas quantidades vestigiais de resveratrol inalterado no plasma (Artero *et al.*, 2015).

O resveratrol é metabolizado pelas enzimas hepáticas de fase II, levando à produção de metabolitos, resveratrol-3-O-glucuronido, resveratrol 3-O-sulfato e derivados 4'-O-glucuronidos, que retêm alguma atividade biológica (Figura 7) (Udnigwe *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2008; Ogas *et al.*, 2013; Torres, *et al.*, 2010; Messina *et al.*, 2015). Como consequência, o primeiro passo hepático deixa pouco resveratrol livre (Gambini *et al.*, 2015), tendo este um tempo de semi-vida de 8-14 min (Torres, *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2008).

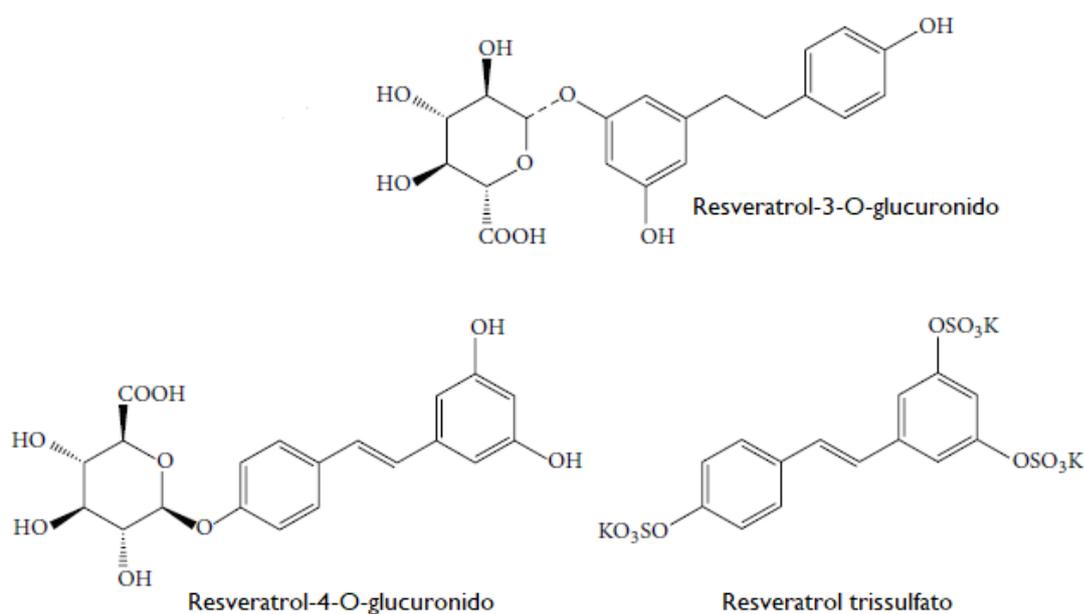


Figura 7 - Metabolitos do resveratrol (adaptado de Gambini *et al.*, 2015).

Os conjugados glucuronidos e sulfatados são as principais espécies de resveratrol encontradas no plasma (Kapetanovic *et al.*, 2011). Aliás a conjugação com glucuronido ou sulfato é a via metabólica mais provável para vários polifenóis (Henry-Vitrac *et al.*, 2006). Sabe-se que os metabolitos do resveratrol são muito menos tóxicos que o resveratrol, levantando a possibilidade de que a glucunoridação do resveratrol possa ter um papel na desintoxicação, e prolongamento da eficácia do resveratrol em humanos (Wang *et al.*, 2004). Tanto em estudos *in vitro* como em estudos *in vivo* a glucunoridação predomina claramente, sendo de grande importância no metabolismo do resveratrol, com uma pequena contribuição pela sulfatação (Kaldas *et al.*, 2003).

Uma das abordagens possíveis que pode aumentar a biodisponibilidade deste composto é obter análogos ou derivados de resveratrol com atividade comparável. A modificação regioselectiva da posição 3-OH é de grande interesse (Torres, *et al.*, 2010). Os grupos fenólicos do resveratrol nas posições 3 e 4' exibem uma reatividade muito semelhante, uma vez que, os grupos fenólicos nas posições 3 e 5 são quimicamente equivalentes devido ao resveratrol ser uma molécula simétrica. Portanto, a biocatálise poderia ser um método a usar devido à extraordinária seletividade das enzimas, com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade do resveratrol (Torres, *et al.*, 2010).

A metilação do resveratrol pode aumentar a sua biodisponibilidade, sem perda da sua atividade biológica (Marel *et al.*, 2008; Colin *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2011). Um exemplo, é o pterostilbeno (4 - [( E ) - 2 - (3, 5 - dimetoxifenil) etenil] fenol), um análogo do éter dimetílico do resveratrol com a mesma atividade *scavenging* do resveratrol, tem uma biodisponibilidade de 80% em ratos, ao contrário de 20 % para o resveratrol (Kapetanovic *et al.*, 2011).

A mínima modificação no núcleo do resveratrol pode causar grandes variações na atividade biológica (Torres, *et al.*, 2010). Alvos desejáveis do resveratrol exigiriam o uso destes derivados para alcançar o local de ação aumentando a biodisponibilidade, o pico de concentração no plasma e a estabilidade geral da molécula (Ogas *et al.*, 2013).

#### 1.1.1.2. Polidatina

A polidatina (3, 4', 5-tri-hidroxiestilbeno-3-O-β-D-glucopiranosídeo) a forma glicosilada do resveratrol (Ding *et al.*, 2014), é um composto monocristalino natural isolado da raiz e rizoma de uma planta medicinal tradicional chinesa *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc (Polygonaceae), uma planta com valor medicinal e nutricional (Xu *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016a; Le *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2017; Ling *et al.*, 2016). A raiz de *P. cuspidatum* é uma das ervas medicinais tradicionais mais utilizadas para o tratamento de algumas doenças como aterosclerose, asma, hipertensão, cancro, doenças cardíacas, entre outras (Zhang *et al.*, 2009). Os principais constituintes associados a estas propriedades, são os estilbenos e as antraquinonas (Zhang *et al.*, 2009).

A forma mais abundante do resveratrol na Natureza é a *trans*-polidatina (3, 4', 5-tri-hidroxiestilbeno-3-β-D-glucósido; E-polidatina; polidatina) (Le *et al.*, 2017). A estrutura da polidatina é semelhante à do resveratrol, na qual uma glucose liga-se na posição C-3,

substituindo assim um grupo hidroxilo (Figura 8) (Xu *et al.*, 2016b; Ling *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; De Maria *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015). Esta substituição dá origem a mudanças conformacionais na molécula, resultando em mudanças nas suas propriedades biológicas. A polidatina é mais resistente à oxidação enzimática do que o resveratrol. Além disso, ao contrário do resveratrol que penetra passivamente na célula, a polidatina entra na célula através de um mecanismo ativo usando transportadores de glicose. Estas propriedades tornam a polidatina uma molécula dotada de maior biodisponibilidade em relação ao resveratrol (Cao *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2015; Lanzilli *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016b; Xie *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Ravagnan *et al.*, 2012).

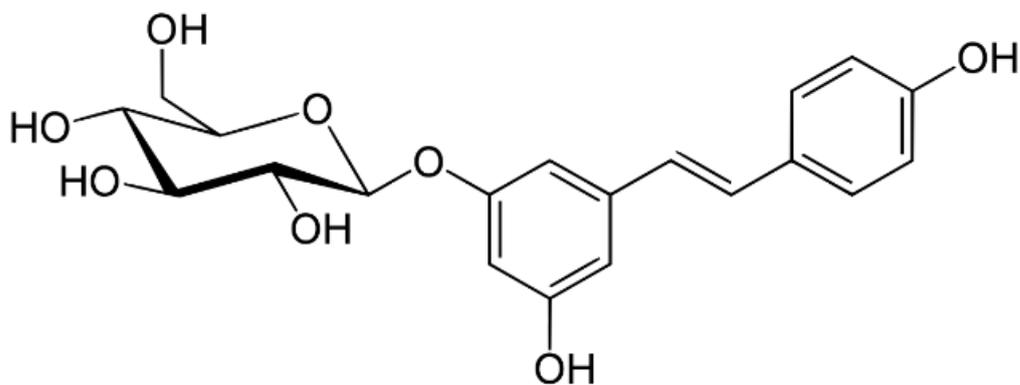


Figura 8 - Estrutura química da polidatina.

A polidatina está presente na alimentação humana, é detetada em uvas, amendoins, vinho tinto e produtos que contêm cacau. Este composto é o principal derivado do resveratrol em muitas plantas e geralmente está presente em quantidade maiores que o próprio resveratrol (Kuo *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016 a; Lv *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2017). A concentração da polidatina excede a do resveratrol em 5 a 10 vezes na raiz e rizoma de *P. cuspidatum* (Le *et al.*, 2017).

No vinho, a concentração de *trans*-polidatina é mais elevada que a concentração de *trans*-resveratrol. O *cis*-resveratrol e o *cis*-polidatina são tipicamente encontrados em concentrações mais baixas, sendo geralmente, biologicamente menos ativos que as suas formas *trans* (Vitrac *et al.*, 2005). No vinho tinto, o teor de *cis*-resveratrol é aproximadamente 5 mg / L, o teor de *trans*-polidatina é aproximadamente 30 mg / L e o teor de *cis*-polidatina é aproximadamente 15 mg / L. Embora os dados acerca do teor destes compostos no vinho branco sejam escassos, o conteúdo livre de *trans*-resveratrol varia entre 0 e 0,2 mg / L, o teor de *cis*-resveratrol é aproximadamente 0,1 mg / L, o *trans*-resveratrol

ocorre em concentrações de 0,3 mg / L e o *cis*-resveratrol não está presente em quantidades detetáveis (Spender & Crozier, 2012). É de notar que a concentração destes compostos tanto no vinho branco como no vinho tinto é influenciada pelas técnicas de vinificação, particularmente pela maceração da pele da uva. Esta quando ocorre aumenta a quantidade destes compostos no vinho, uma vez que tanto o resveratrol como o polidatina são encontrados principalmente na pele da uva (Mattivi *et al.*, 1995; Jeandet *et al.*, 1995).

No sumo de uva, a concentração da polidatina é cerca de sete vezes maior do que a concentração de resveratrol (Basholli-Salih *et al.*, 2016; Fabris *et al.*, 2008) e no cacau a quantidade de polidatina é quatro vezes maior do que a do resveratrol (Basholli-Salih *et al.*, 2016).

Tanto em animais como em humanos, a polidatina administrada oralmente é absorvida em minutos, metabolizada em minutos e eliminada em 24 horas (Burkon *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2006). Durante este processo, são encontrados alguns metabolitos da polidatina que incluem resveratrol e resveratrol glucuronado e / ou sulfonado (Lv *et al.*, 2006; Burkon *et al.*, 2008).

Após ingestão oral da polidatina esta pode ser hidrolisada em resveratrol pelas bactérias intestinais (Zhou *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008) ou pode sofrer glucoronidação no fígado, dando origem ao glucuronido do resveratrol (Zhou *et al.*, 2009). Este mecanismo permite assim uma maior quantidade de resveratrol disponível na dieta (Zhou *et al.*, 2009).

Zhou *et al.* (2008) mostraram que após ingestão horal de polidatina, em ratos, o conteúdo desta foi muito alto nos primeiros 90 min e muito baixo após 240 min no estômago. Já no intestino, o conteúdo de polidatina foi baixo nos primeiros 90 min e aumentou significativamente após 240 min. Em relação ao conteúdo de resveratrol, este foi baixo no estômago e mais alto no intestino após 240 min. Estes resultados confirmam que as bactérias intestinais hidrolisam a ligação glicosídica da polidatina. Portanto, a polidatina pode ser facilmente metabolizada pelas bactérias intestinais transformando-se em resveratrol (Zhou *et al.*, 2008).

Também em humanos, Burkon *et al.* (2008) mostraram que após administração oral de polidatina, esta também é hidrolisada enzimaticamente no intestino pelas bactérias intestinais em resveratrol. Neste estudo os principais metabolitos encontrados são resveratrol e o resveratrol glucuronado e sulfonado (Burkon *et al.*, 2008).

Lv *et al.* (2006) mostraram que a polidatina é distribuída por vários órgãos, incluindo o cérebro. A distribuição da polidatina no cérebro mostrou que esta tinha a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica após administração oral, o que confirma os relatos de que a polidatina mostra efeitos protetores contra a lesão cerebral. É de salientar que os principais órgãos de distribuição da polidatina em ratos são o estômago e o intestino delgado (Lv *et al.*, 2006).

A fim de aumentar a produção de resveratrol, o passo de hidrólise da ligação glicosídica é de grande interesse, de modo a transformar o polidatina em resveratrol, com o objetivo de desenvolver novos produtos bioativos (Kuo *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2017; Basholli-Salih *et al.*, 2016).

A conversão de polidatina em resveratrol pode ser mediada pela celulase comercial de *A. aculeatus*, usando extratos da raiz de *P. cuspidatum*. Após a reação, o conteúdo de resveratrol no extrato aumentou de 2,72 mg / g para 9,49 mg / g, enquanto que o conteúdo do polidatina diminuiu de 8,60 mg / g para 0 mg / g. O resultado fornece um método útil que aumenta a produção de resveratrol a partir de matérias vegetais. A celulase é uma enzima acessível e possui potenciais aplicações na indústria alimentar, de forma a transformar em larga escala o polidatina em resveratrol (Kuo *et al.*, 2016).

Vários estudos relatam que a polidatina tem propriedades biológicas semelhantes às do resveratrol ou ainda mais ativas do que as deste. No caso dos efeitos antioxidantes, a polidatina tem efeitos antioxidantes mais potentes do que resveratrol devido às suas propriedades biológicas resultantes da diferença conformacional (Su *et al.*, 2013; Fabris *et al.*, 2008). Aliás foi relatado que a polidatina apresenta efeitos antioxidantes mais eficazes na inibição da peroxidação lipídica do que o resveratrol (Fabris *et al.*, 2008).

Xu *et al.* (2016 a) avaliaram, a atividade antioxidante da polidatina e o seu potencial efeito protetor em ratos. Neste estudo, a D-galactose foi usada para induzir lesões no fígado e no cérebro. Os resultados mostraram que a polidatina exibiu uma forte atividade antioxidante, protegendo os ratos do *stress* oxidativo induzido pela D-galactose, diminuindo a produção de ROS e o nível de peroxidação lipídica. O mecanismo subjacente ao seu efeito protetor, além de estar associado à sua atividade antioxidante, deve-se também ao seu efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico. Ficou demonstrado neste estudo que o tratamento com polidatina reduz a lesão hepática e cerebral induzida por D-galactose, melhorando a função hepática e cerebral, melhorando as alterações histológicas, reduzindo a produção de ROS e atenuando a inflamação e a apoptose (Xu *et al.*, 2016 a).

Ainda relacionado com o estudo acima referido, Xu *et al.* (2016 a) provaram que a polidatina pode ser um agente importante no que toca ao antienvelhecimento. A D-galactose acelerou o processo de envelhecimento, nos ratos em estudo, caracterizado por mudanças na aparência e diminuição do peso corporal, mas também pelo aumento da produção de ROS. Estes autores mostraram que o tratamento com polidatina reverteu estas mudanças causadas pela administração de D-galactose, indicando o pronunciado efeito antienvelhecimento da polidatina neste modelo. Assim, este composto mostrou potencial para o desenvolvimento de fármacos associados ao antienvelhecimento (Xu *et al.*, 2016 a).

A polidatina inibe a agregação de plaquetas, diminui os níveis séricos de colesterol total (Ding *et al.*, 2014), tem um efeito neuroprotetor sobre a lesão cerebral causada por isquemia / reperfusão, promove a perda de peso e melhora a função cardíaca e a microcirculação (Zhang *et al.*, 2015; Yang & Zhao, 2017). Foi relatado que a polidatina reduz os níveis lipídicos em ratos e coelhos hiperlipidémicos (Du *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2009).

Alguns autores demonstraram que a polidatina e a sua aglicona, o resveratrol, regulavam a via de sinalização Sonic hedgehog (Shh) em diferentes modelos (Cheng *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2015). Shh é uma proteína extracelular que participa numa série de processos celulares como a diferenciação, a proliferação e apoptose em vários tecidos. (Choudhry *et al.*, 2014). Descobriu-se que a expressão de Shh foi regulada em órgãos isquémicos, incluindo coração, cérebro e fígado, nos quais Shh estava implicado na proteção contra lesão isquémica / reperfusão por mecanismos anti-apoptóticos, anti-oxidantes e anti-inflamatórios e, portanto, promoveu a reparação do tecido danificado (He *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Paulis *et al.*, 2015).

Meng *et al.* (2016) estudaram os efeitos da polidatina no tratamento da lesão renal isquémica / reperfusão, associados à ativação da via de sinalização Shh. Curiosamente, estes autores mostraram que o bloqueio da via de sinalização Shh inibiu significativamente os efeitos benéficos da polidatina tanto *in vitro* como *in vivo*. Estes resultados revelam que a ativação de Shh pode estar, pelo menos em parte, associada aos efeitos anti-apoptóticos e anti-oxidantes da polidatina em ratos com lesão renal. Pode-se considerar que Shh pode ser um novo alvo terapêutico para o uso clínico da polidatina de modo a promover a regeneração do tecido lesado provocado por isquémica / reperfusão (Meng *et al.*, 2016).

Os efeitos nefroprotetores da polidatina são relatados na nefropatia úrica, estimulada pela frutose. Observou-se que a polidatina inibiu a atividade da xantina oxidase que levou à supressão do nível de ácido úrico *in vivo* e *in vitro*. O efeito nefroprotetor da polidatina

deveu-se à acentuada supressão da cascata inflamatória relacionada ao *stress* oxidativo (induzido pelo ácido úrico), incluindo diminuição da expressão de NF-kB p65, COX-2 e inibição da expressão de TNF- $\alpha$ , PGE2 e IL-2 (Chen *et al.*, 2013).

Su *et al.* (2013) e Liu *et al.* (2011) descobriram que a polidatina pode matar significativamente várias linhas de células tumorais humanas de maneira dose-dependente, o que sugere que esta pode ser um composto antitumoral promissor (Su *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2014) descobriram que a polidatina tem efeitos inibidores potentes no crescimento de células cancerígenas da mama, leucemia, pulmão, colo uterino, ovário, fígado e nasofaringe (Zhang *et al.*, 2014). Mais especificamente, Liu *et al.* (2011) mostraram que as células CNE do carcinoma nasofaríngeo humano exibiram sensibilidade dependente do tempo e da dose à polidatina, com valores de IC50 em torno de 7 mmol / L às 24 horas. Adicionalmente, a polidatina matou células HeLa do carcinoma cervical humano, células da linha celular SMMC-7721 do hepatoma e células da linha celular do carcinoma epidérmico A-431 de uma maneira dependente da dose (Liu *et al.*, 2011).

Xu *et al.* (2016 b) estudaram o efeito da polidatina em células do osteossarcoma humano, I43B e MG63. Os resultados revelaram que a polidatina induziu a apoptose e inibiu a proliferação de células, atenuando a sinalização da  $\beta$ -catenina. Portanto, os resultados revelaram que a polidatina teve o efeito anticancerígeno nas linhas celulares do osteossarcoma humano (Xu *et al.*, 2016 b). Zhang *et al.* (2014) estudaram o efeito anticancerígeno da polidatina nas linhas celulares A549 e NCI-H1975 do cancro do adenocarcinoma do pulmão. Este estudo mostrou o efeito anticancerígeno da polidatina que induziu a apoptose e suprimiu a progressão do ciclo celular (Zhang *et al.*, 2014). A polidatina inibe a angiogénese em células endoteliais da veia umbilical humana e suprimir a síntese de DNA no carcinoma pulmonar de Lewis (Kimura & Okuda, 2000).

De modo a testar a citotoxicidade da polidatina em células normais, Liu *et al.* (2011) adicionaram polidatina nas concentrações de 5-20 mmol em células HaCaT de queratinócitos humanos e em células mononucleares de sangue periférico humano (Liu *et al.*, 2011). Também Zhang *et al.* (2014) examinaram o efeito citotóxico da polidatina em células HBE não neoplásicas (Zhang *et al.*, 2014). Ambos os estudos revelaram que a polidatina não afeta a sobrevivência de células normais, indicando que esta apresenta baixo efeito citotóxico em células saudáveis (Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

Estas descobertas indicam que a polidatina tem um efeito anticancerígeno em várias linhas celulares (Xu *et al.*, 2016 b; Kimura & Okuda, 2000; Liu *et al.*, 2011) e um baixo efeito

citotóxico em células normais, sendo um candidato anticancerígeno favorável para vários tipos de cancro (Xu *et al.*, 2016 b; Kimura & Okuda, 2000; Liu *et al.*, 2011).

Numerosos estudos relataram que a polidatina modula a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão celular *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, é relatado que a IL-17 induz uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo IL-8, IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , entre outros. A polidatina diminui a produção de IL-17 em células mononucleares de sangue periférico humano através de regulação da expressão de mRNA de IL-17 em células. Este fato sugere o possível papel regulador da polidatina a nível transcricional e pós-transcricional (Lanzilli *et al.*, 2011).

Demonstrou-se também que a polidatina exerce efeitos cardioprotetores. Ling *et al.* (2016) investigaram o efeito do pós-tratamento com polidatina na lesão miocárdica, ativando a autofagia (Ling *et al.*, 2016). A lesão miocárdica induzida por isquemia / reperfusão causa stress oxidativo mitocondrial e morte celular (Luo *et al.*, 2013). Ling *et al.* (2016) verificaram que o tratamento com polidatina exerce efeitos protetores significativos no miocárdio, não apenas promovendo o fluxo autofágico e eliminando mitocôndrias danificadas, diminuindo a produção de ROS e morte celular, como também restringindo a inflamação e, assim, fortalecimento da função cardíaca, *in vivo* e *in vitro* (Ling *et al.*, 2016).

Cao *et al.* (2017) investigaram os possíveis efeitos da polidatina na lesão pulmonar (pneumonite e fibrose pulmonar), induzida por radiação, *in vivo* e *in vitro*. Neste estudo, a polidatina inibiu a transição epitelial-mesenquimal, inibiu a expressão de citocinas inflamatórias, eliminou radicais livres e aumentou a expressão de Sirt-3, atenuando a inflamação induzida pela radiação (Cao *et al.*, 2017). Também foi relatado que a polidatina exibe efeitos protetores na lesão pulmonar aguda estimulada por LPS através da inibição da via de sinalização TLR4-MyD88-NF- $\beta$ , *in vivo* e *in vitro* (Jiang *et al.*, 2015).

A inflamação e o stress oxidativo desempenham um papel importante na patogénese cerebral. Ji *et al.* (2012) submeteram ratos a oclusão permanente da artéria cerebral média. A polidatina diminuiu a expressão de Gli I e Patch I que aumentam após isquémia cerebral e inibiu a via de sinalização NF- $\kappa$ B responsável pela libertação de citocinas inflamatórias, protegendo o cérebro dos danos causados pela oclusão da artéria cerebral. Gao *et al.* (2016) também estudaram o efeito neuroprotetor da polidatina após indução de lesão cerebral isquémica por oclusão da artéria cerebral média, em ratos. Os resultados demonstraram que a polidatina protegeu os neurónios da morte celular, aumentando a expressão do regulador da apoptose BCL-2, impedindo a libertação do citocromo C no citoplasma e diminuindo as

espécies reativas de oxigénio (ROS) nos neurónios. Estes achados sugerem que a polidatina tem um duplo efeito, melhora o *stress* oxidativo e impede a apoptose, tornando-se uma terapia promissora no tratamento do acidente vascular cerebral isquémico (Gao *et al.*, 2016).

Ambos os estudos demonstram os efeitos biológicos da polidatina através das suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-apoptóticas (Ji *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016).

Os efeitos hepatoprotetores da polidatina estão intimamente relacionados às atividades anti-inflamatória e anti-oxidativa. A polidatina exibiu efeitos anti-inflamatórios sobre a lesão hepática induzida pela estreptozotocina em ratos diabéticos através da ativação de PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\beta$  e subsequente inativação da via de sinalização de NF- $\kappa$ B e, portanto, inibiu a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e diminuiu a expressão de iNOS e COX-2. Por outras palavras, o efeito hepatoprotetor da polidatina na diabetes mellitus pode resultar do seu efeito anti-inflamatório induzido pela ativação de PPAR- $\alpha$  e - $\beta$ , especialmente do PPAR- $\beta$  (Xue *et al.*, 2017).

Noutro estudo, a polidatina utilizada isoladamente ou em combinação com o resveratrol, aumentou a libertação da beta-defensina-2 (HBD-2), um péptido anti-microbiano (Ravagnan *et al.*, 2012). Os péptidos antimicrobianos produzidos por queratinócitos, entre os quais a família  $\beta$ -defensina, contribuem para o mecanismo de defesa do hospedeiro contra infeções bacterianas, fúngicas e virais (Zasloff, 2002). Vários estudos indicaram que as HBDs são potenciais moduladores da inflamação devido aos seus efeitos na apoptose polimorfonuclear. Nagaoka *et al.* (2008) demonstraram que as HDBs podem potencialmente suprimir a apoptose polimorfonuclear e prolongar a sua vida útil, contribuindo assim para a defesa contra insultos externos (Nagaoka *et al.*, 2008). Estes resultados podem abrir caminho para um uso racional da polidatina e do resveratrol na dermocosmética ou em preparações farmacológicas. Estas moléculas usadas em combinação podem, assim, ativar a resposta citoprotetora e proteger a pele de danos causados por microrganismos patogénicos ou outros fatores de *stress* ambientais (Ravagnan *et al.*, 2012).

A polidatina, um composto isolado de *P. cuspidatum* exhibe inúmeros efeitos farmacológicos benéficos confirmados por várias investigações, incluindo a atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e os seus efeitos neuroprotetores, cardioprotetores, nefroprotetores, pulmonares e hepatoprotetores, o que torna a polidatina um potencial agente auspicioso a ser aplicado em diversas terapias (Du *et al.*, 2013).

## 1.2. Biocatálise: Princípios e Aplicações

As enzimas são proteínas que evoluíram de forma eficiente, sob as condições suaves necessárias, de modo a preservar a funcionalidade e integridade dos sistemas biológicos. (Illanes, 2008). A enzima é o catalisador da vida (Illanes, *et al.*, 2014). Dentro de uma célula, as enzimas atuam como biocatalisadores, gerando inúmeras reações químicas e coordenando várias funções celulares (Moo-Young, 2011). As enzimas podem então ser consideradas catalisadores que foram otimizados através da evolução, de forma, a realizarem a sua tarefa fisiológica sobre a qual todas as formas de vida dependem (Illanes, 2008).

Cada uma das reações químicas, que compõem as complexas redes metabólicas encontradas em todas as formas de vida, são catalisadas por uma enzima. As enzimas são entidades biológicas que convertem a informação em ação. São rigorosamente reguladas tanto por controlo a nível genómico como por sinais ambientais que condicionam o seu modo de ação (Illanes *et al.*, 2014).

As enzimas são estruturas moleculares complexas altamente desenvolvidas, adaptadas para realizar uma tarefa específica com eficiência e precisão. Podem estar conjugadas ou não com outras moléculas, mas a sua condição catalítica reside na sua estrutura proteica - o sítio ativo (Illanes *et al.*, 2014). Ou seja, a atividade enzimática, isto é, a capacidade de uma enzima para catalisar uma reação química, é estritamente dependente da sua estrutura molecular (Illanes, 2008). O sítio alvo representa uma porção muito pequena da estrutura enzimática (apenas alguns resíduos de aminoácidos), enquanto que a restante parte da molécula, designada de “scaffold”, proporciona a estabilidade estrutural necessária (Illanes *et al.*, 2014; Illanes, 2008). O substrato é ligado no local ativo da enzima e, assim, são produzidas alterações nas suas ligações químicas, que levam às reações enzimática e, por conseguinte, à formação de produtos. No final da reação, os produtos são libertados da enzima que está pronta para o próximo ciclo catalítico (Illanes, 2008).

A sequência de aminoácidos de uma enzima determina a singularidade da sua estrutura molecular e, por conseguinte, a sua atividade biológica. A Natureza criou uma enorme diversidade de enzimas com estruturas moleculares diversificadas, com especificidade para cada substrato, de modo a realizar e regular todos os tipos de reações bioquímicas. É de salientar que mesmo para catalisar a mesma reação, estão disponíveis múltiplas formas enzimáticas. Um dos principais interesses das enzimas é a aplicação das suas atividades biológicas, de modo a catalisar reações químicas de interesse prático,

particularmente em aplicações que envolvem fabrico industrial e processamento ambiental (Moo-Young, 2011).

A biocatálise tem sido amplamente considerada um dos três principais pilares para a síntese catalítica assimétrica, devido em grande parte à elevada seletividade das enzimas e às condições reacionais favoráveis e amigas do meio ambiente (Chang *et al.*, 2016).

A catálise enzimática refere-se ao uso de enzimas como catalisadores biológicos dissociados da célula a partir da qual derivam. O principal desafio neste processo é a construção de catalisadores enzimáticos robustos, capazes de realizar, nas condições de reação geralmente difíceis, um processo industrial. O objetivo é preservar as propriedades notáveis das enzimas como catalisadores (especificidade, reatividade), ao mesmo tempo em que se superam as suas limitações (principalmente a sua baixa estabilidade conformacional) (Illanes *et al.*, 2014). Os prós e os contras das enzimas como catalisadores são, portanto, a consequência da sua estrutura molecular complexa. As enzimas são catalisadores lábeis, em que a estabilidade enzimática é um problema importante na biocatálise e um pré-requisito para a maioria das suas aplicações (Illanes *et al.*, 2014; Bommarius & Riebel, 2004).

Os processos biocatalíticos estão fortemente focados na produção sustentável de produtos químicos, materiais e combustíveis a partir de recursos renováveis. Estes processos não utilizam matérias-primas tóxicas, produzindo significativamente menos resíduos perigosos (Bommarius & Riebel, 2004; Baltz *et al.*, 2010). Além disso, operam em condições de reação suave empregando um catalisador que é biocompatível, biodegradável e derivado de recursos renováveis (Patel, 2016; Tao & Kazlauskas, 2011).

A biocatálise é uma das tecnologias mais verdes para a síntese de moléculas bioativas, para as quais a presença de vários grupos funcionais requer processos seletivos de proteção ou desproteção (Barbayanni & Kokotos, 2012). Como as enzimas são altamente seletivas, a catálise enzimática não requer etapas de proteção e desproteção dos grupos funcionais (Patel, 2016; Tao & Kazlauskas, 2011). A biocatálise pode ajudar a encurtar sínteses complicadas de 12 para apenas 3 ou 4 etapas, reduz os custos de fabrico de 40 a 60 % e reduz as despesas de capital em mais de 25 %, ao mesmo tempo que minora a pegada ambiental. Todos estes fatores geralmente traduzem-se numa redução dos custos de produção e num aumento da competitividade, especialmente em países altamente regulamentados (Baltz *et al.*, 2010).

A biocatálise é considerada uma ferramenta poderosa da biotecnologia, tendo um profundo impacto na saúde, na proteção ambiental e na produção sustentável de

combustíveis. A biocatálise está a ganhar um lugar proeminente no âmbito da química verde acompanhada pelos avanços em diversos setores, como a genética, a biológica molecular, a bioinformática, a nanotecnologia, entre outros (Illanes *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas como catalisadores

As reduções de custos e o aumento dos requisitos de qualidade, segurança, saúde e meio ambiente das transformações biocatalíticas, ao contrário das transformações químicas industriais fortalecem cada vez mais uma pesquisa na área da biocatálise em aplicações industriais (Wohlgemuth, 2010).

Independentemente da matéria-prima inicial ou do processo, a biocatálise oferece várias vantagens significativas em relação à quimio-catálise. As enzimas funcionam a temperaturas e pressões moderadas, realizam transformações altamente seletivas (regio, enantio ou quimio) e, portanto, as etapas de proteção e desproteção do grupo funcional são desnecessárias (Baltz *et al.*, 2010; Barbayanni & Kokotos, 2012; Dordick, 2013). É ainda de notar que as enzimas podem ser extremamente rápidas, aumentando as taxas de reação em 4 a 12 vezes (Baltz *et al.*, 2010). Uma vez que os biocatalisadores são biodegradáveis e raramente contêm metais pesados, os resíduos que resultam do processo são muito mais manejáveis, exigindo um tratamento mínimo (Seldon, 2016). E, por último, uma vez que a maioria dos biocatalisadores funciona em meios aquosos, as emissões de compostos orgânicos voláteis podem ser drasticamente reduzidas (Baltz *et al.*, 2010).

A atividade enzimática em condições suaves é um atributo valioso para a produção de compostos lábeis, com profundas implicações tecnológicas, reduzindo significativamente os custos de equipamentos, energia e operações a jusante (Illanes *et al.*, 2012; Bommarius & Riebel, 2004).

As enzimas são catalisadores altamente desejáveis quando a especificidade da reação é uma questão importante (como ocorre em produtos farmacêuticos e produtos químicos finos), quando os catalisadores devem ser ativos em condições suaves (devido à instabilidade do produto e/ou substrato ou para evitar reações indesejáveis, como ocorre em várias reações de síntese orgânica), quando as restrições ambientais são rigorosas (uma situação bastante atual que dá à biocatálise uma vantagem distinta em relação às tecnologias alternativas). Além disso, as enzimas são catalisadores bastante promíscuos, uma vez que são capazes de catalisar várias reações e / ou transformar muitos substratos, além daqueles para os quais são fisiologicamente especializados (Illanes, 2008; Dordick, 2013).

No caso de se tratar de produtos farmacêuticos, ou mesmo produtos químicos finamente relacionados, a pureza do produto é o mais preocupante. A seletividade acima de 95 % é difícil de alcançar por quimiocatálise e, se essenciais para a síntese, exigem o uso da biocatálise (Baltz *et al.*, 2010).

No entanto, as enzimas apresentam estruturas moleculares complexas, lábeis e dispendiosas de produzir. Além disso, estas apresentam disponibilidade limitada, baixa estabilidade operacional, requisito de co-fatores complexos e ciclos de desenvolvimento muito longos para novos e melhorados biocatalizadores. Estas são algumas desvantagens das enzimas em relação aos catalisadores químicos (Bommarius & Riebel, 2004; Illanes *et al.*, 2012).

Apesar das limitações do uso de enzimas como catalisadores, pode-se considerar que estas são muito mais vantajosas, combinando a sustentabilidade ambiental, o alto grau de seletividade e as condições reacionais suaves na produção ambientalmente benigna de compostos bioativos (Barbayanni & Kokotos, 2012; Bommarius & Riebel, 2004).

### 1.2.2. Classificação das enzimas

De acordo com a *União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular* as enzimas são divididas em seis classes, com base no tipo de reação química que catalisam: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Illanes *et al.*, 2012; Lobedanz *et al.*, 2016; Liese *et al.*, 2008; Dordick, 2013; Bommarius & Riebel, 2004). Centenas de enzimas são utilizadas industrialmente, mais de metade derivam de fungos, mais de um terço derivam de bactérias, sendo as restantes provenientes de fontes animais (8%) e de plantas (4%) (Illanes *et al.*, 2012; Dordick, 2013).

Um número de quatro dígitos é atribuído a cada enzima pela *Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular*: o primeiro denota a família, o segundo indica a subclasse dentro de uma família e está relacionada com o tipo de grupo químico sobre o qual a enzima age, o terceiro denota um subgrupo dentro de uma subclasse e está relacionado aos grupos químicos específicos envolvidos na reação e o quarto é o número correlativo de identificação dentro de um subgrupo (Illanes, 2008; Liese *et al.*, 2008). Por exemplo, em relação à classe 3 (hidrolases), a subclasse 3.1 refere-se às esterases e a subclasse 3.2 às glicosidases, e dentro da 3.1, as sub-subclasses são caracterizadas pela natureza do substrato, por exemplo, a 3.1.1 compreende as hidrolases de éster carboxílico e

a 3.1.2 compreende as hidrólases de tioéster. Assim, obtém-se, por exemplo, a EC 3.1.1.3 que representa as esterases que atuam sobre triglicéridos (Lobedanz *et al.*, 2016).

É importante enfatizar vantagem de dispor de uma classificação enzimática baseada nas reações catalisadas pelas enzimas, facilitando a escolha de um biocatalisador apropriado para a reação desejada (Liese *et al.*, 2008).

### 1. Oxidorredutases (EC 1)

Todas as enzimas envolvidas nas reações de oxidação-redução pertencem a esta classe. Os substratos que sofrem oxidação e redução são referidos como doadores e aceptadores de hidrogénio, respetivamente (Khan *et al.*, 2015; Liese *et al.*, 2008; Dordick, 2013; Boyce & Tipton, 2001; Krishna, 2002). Quando o substrato oxidante é considerado como doador de hidrogénio, a enzima é chamada de desidrogenase. Se o oxigénio molecular for considerado o aceitador, a enzima é designada de oxidase (Krishna, 2002). Por exemplo, as desidrogenases oxidam um substrato através da transferência de átomos de hidrogénio para uma coenzima ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}^+$ ) que atua como aceitador (Illanes, 2008).

### 2. Transferases (EC 2)

As transferases são enzimas que catalisam a transferência de um grupo funcional de um doador para um aceitador adequado (Illanes, 2008; Liese *et al.*, 2008; Boyce & Tipton, 2001; Krishna, 2002). Por exemplo, estas enzimas transferem grupos funcionais (grupos metilo, glicolsilo, sulfato e fosfato) de um substrato (doador) para outro (aceitador) (Khan *et al.*, 2015; Dordick, 2013). Metiltransferases, aciltransferases, transaminases, fosfotransferases e glicosiltransferases são particularmente relevantes (Illanes, 2008).

As transferases não são comumente usadas na indústria devido a várias razões: as reações de equilíbrio não atingem, geralmente, rendimentos elevados, ocorrem reações de acoplamento, os substratos de transferência de grupo são bastante caros e por ultimo, os produtos correspondentes não são facilmente reciclados. No entanto, as altas taxas de regio e estereoselectividade nas reações catalisadas por estas enzimas são motivos importantes para a sua crescente utilidade (Krishna, 2002).

### 3. Hidrolases (EC 3)

As hidrolases são as enzimas mais facilmente obtidas comercialmente e as mais bem estudadas (Dordick, 2013). Estas enzimas estão geralmente envolvidas na clivagem hidrolítica de ligações tais como C-O, C-N e C-C (Khan *et al.*, 2015; Boyce & Tipton, 2001). A sua função principal é catalisar a hidrólise de uma variedade de compostos, incluindo ésteres e

lípidos, fosfatos e pirofosfatos, sulfatos, glicósidos, péptidos e proteínas (Dordick, 2013). Esterases, proteases e glicosidases são as enzimas mais relevantes. Em condições adequadas, as hidrolases podem catalisar as reações inversas, isto é, a formação de ligações com eliminação de água (Illanes, 2008).

As enzimas hidrolíticas podem ser classificadas como transferases, uma vez que a própria hidrólise pode ser considerada como transferência de um grupo específico para a água como o aceitador. No entanto, na maioria dos casos, a reação com a água como o aceitador foi descoberta mais cedo e é considerada como a principal função fisiológica da enzima. Por isso que é que estas enzimas são classificadas como hidrolases e não como transferases (Boyce & Tipton, 2001).

#### 4. Liases

As liases clivam ligações C-C, C-O, C-N por reações de eliminação resultando na formação de ligações duplas ou anéis (Illanes, 2008; Liese *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2015; Dordick, 2013; Boyce & Tipton, 2011). Nos processos industriais, estas enzimas são as mais comumente usadas em termos sintéticos, o que significa que a reação inversa - adições de uma molécula a um substrato insaturado é de grande interesse (Liese *et al.*, 2008). Neste tipo de reação a sintetase é a enzima mais indicada para a catálise (Boyce & Tipton, 2001). Entre as liases, as enzimas que se destacam são as aldolases, carboxilases e descarboxilases, hidratases e desidratases (Illanes, 2008; Liese *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2015; Dordick, 2013).

#### 5. Isomerases

As isomerases catalisam alterações estruturais ou estereoquímicas dentro de uma determinada molécula. As subclasses comuns incluem racemases, epimerases, oxidorreduzases intramoleculares, mutases, isomerases *cis* e *trans* e liases intramoleculares (Illanes, 2008; Khan *et al.*, 2015; Dordick, 2013; Boyce & Tipton, 2001; Krishna, 2002). Em alguns casos, a reação envolve uma oxido-redução intermolecular, mas uma vez que os grupos doador e aceitador estão na mesma molécula, estas são classificados como isomerases em vez de oxidorreduzases (Boyce & Tipton, 2001).

#### 6. Ligases

Em contraste com todas as outras cinco classes de enzimas, esta última divisão da nomenclatura enzimática é a única em que nenhum membro é utilizado para a produção de quaisquer produtos químicos finos num processo industrial. No entanto, estes biocatalizadores desempenham um papel importante na engenharia genética, pois enzimas

específicas desta classe, conhecidas como DNA ligases, catalisam a formação de ligações C-O na síntese de DNA. Esta reação permite a conexão de duas cadeias de DNA (Liese *et al.*, 2008; Krishna, 2002).

Em geral, as ligases catalisam reações de ligação covalente entre duas moléculas. Estas reações são sempre acopladas à hidrólise de uma ligação pirofosfato em ATP. Com base no tipo de ligações que sintetizam (C-O, C-S, C-N, C-C), esta classe foi dividida em seis subclasses. (Khan *et al.*, 2015; Illanes, 2008; Liese *et al.*, 2008; Dordick, 2013; Boyce & Tipon, 2011; Krishna, 2002).

Tabela 2 - Classe de enzimas e tipo de reações que catalizam (Faber *et al.*, 2015).

Número da classe	Nome da classe	Reação catalisada	Equação da reação
1	Oxidoreductase	Oxidação/Redução	$AH_2 + B = A + BH_2$ ou $AH_2 + B = A + BH + H^+$
2	Transferase	Transferência de grupo funcional de um substrato (doador) para outro (aceitador)	$AB + C = AC + B$
3	Hidrolase	Clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N e C-C	$AB + H_2O = AH + BOH$
4	Liase	Não-hidrolítica / Oxidativa Clivagem de ligações C-O, C-N e C-C via eliminação	$A = B + CD = C-A-B-D$
5	Isomerase	Mudanças conformacionais	$A = B$
6	Ligase	Clivagem de ligação dentro de duas moléculas que formam ligações C-O, C-S, C-N, C-C acopladas com a hidrólise de uma molécula de trifosfato	$A + B + NTP = AB + NDP + P_i$ ou $A + B + NTP = AB + NMP + PP_i$

De entre as seis famílias de enzimas, as hidrolases são as enzimas mais usadas para biotransformações industriais. Estima-se que aproximadamente 80 % das enzimas usadas industrialmente sejam hidrolases, seguidas das oxidoreductases (Krishna, 2002; Bommarius & Riebel, 2004; Brahmachari, 2016). As hidrolases são enzimas robustas e bastante simples. Além disso, apresentam baixo custo e funcionam bem em condições reacionais suaves (Illanes, 2008).

### 1.2.3. Mecanismo catalítico e aplicações das hidrolases

As enzimas são cada vez mais aplicadas à síntese de uma grande variedade de compostos orgânicos, particularmente, devido às suas propriedades enantio-, quimio- e regioselectivas e também porque substituem os processos químicos tradicionais, (Torres-Gavilán *et al.*, 2006).

As hidrolases são enzimas que catalisam a quebra de ligações químicas (C-O, C-N e C-C) na presença de água (Khan *et al.*, 2015; Gaber, 2012). São classificadas como EC 3 de acordo com o sistema de nomenclatura. Em geral, estas enzimas possuem propriedades atraentes para aplicações biocatalíticas e industriais. Por exemplo, são independentes de cofatores, aceitam moléculas não naturais como substratos, possuem elevada estereoselectividade e capacidade de realizar reações reversas sob condições livres de água. Além disso, estão facilmente disponíveis, pois apresentam um custo de produção relativamente baixo (Gaber, 2012; Danieli & Riva, 1994).

As lipases são classificadas como triacilglicerol acil-hidrolases (E.C. 3.1.1.3) e fazem parte do grupo das enzimas serina hidrolases (Tood *et al.*, 2001). Compreendem um grupo de enzimas que ocorre amplamente em todo o reino animal e vegetal (Macrae & Hammond, 1985; Borgdorf & Warwel, 1999), sendo sintetizadas por plantas, animais e microorganismos (Illanes, 2008; Faber, 2011). São excretadas como enzimas extracelulares, e portanto, podem ser convenientemente produzidas em grandes quantidades, de modo que, como um todo, são agora consideradas os biocatalisadores mais promissores para aplicações biotecnológicas (Illanes, 2008; Faber, 2011).

As lipases de microrganismos, principalmente bacterianas e fúngicas, são as mais utilizadas como biocatalisadores em aplicações biotecnológicas e em química orgânica, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética e ao crescimento rápido de microrganismos em meios baratos (Illanes, 2008; Fang *et al.*, 2006).

A função biológica destas enzimas é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis de cadeia longa e outros ésteres insolúveis de ácidos gordos com comprimento de cadeia variável (Pleiss *et al.*, 1998; Faber, 2011; Illanes, 2008), de modo a formar ácidos gordos livres, triacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (Macrae & Hammond, 1985). A taxa de hidrólise dos triacilgliceróis é normalmente mais rápida que a dos diacilgliceróis (Macrae & Hammond, 1985). Esta reação é reversível, de modo que as enzimas também catalisam a

formação de acilgliceróis a partir de glicerol e ácidos gordos livres (Macrae & Hammond, 1985). Em contraste, as esterases são restritas a ésteres solúveis em água de ácidos carboxílicos (Pleiss *et al.*, 1998).

A estrutura da lipase é caracterizada pela presença de uma dobra de  $\alpha / \beta$  hidrolase. A dobra  $\alpha / \beta$  hidrolase consiste numa folha  $\beta$  hidrofóbica central entre as duas camadas de  $\alpha$ -hélices anfífilas (Figura 9) (Pleiss *et al.*, 1998).

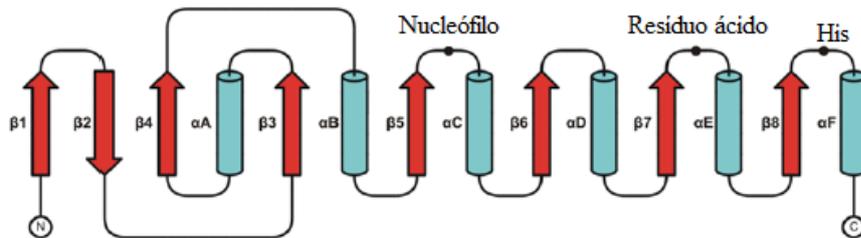


Figura 9 - Ilustração do diagrama de topologia da dobra canônica  $\alpha / \beta$ -hidrolase. (Adaptado de Gaber, 2012).

As lipases também são capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação. Na esterificação, a enzima liga um ácido gordo a um álcool por uma ligação covalente, sintetizando um éster e libertando uma molécula de água. Reações mecanisticamente equivalentes são tio-esterificação e amidação, onde o álcool é substituído por um tiol ou uma amida. Reações de transesterificação catalisadas por estas incluem alcoólise, acidólise e aminólise (Castillo *et al.*, 2015). Mais recentemente, novas e úteis aplicações foram relatadas para diferentes lipases, nomeadamente em reações de adição de Michael catalisadas por lipases. Entre os diferentes tipos de ligações que podem ser formadas através desta reação, as mais significativas são as ligações C – C, C – N, C – O ou C – S (Cai *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Reações catalisadas pelas lipases (adaptado de Castillo *et al.*, 2015).

**Sistema Aquoso**

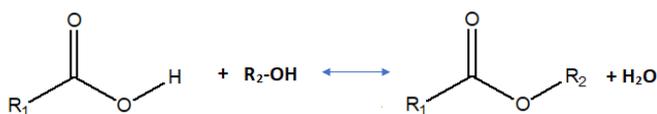
**HIDRÓLISE**



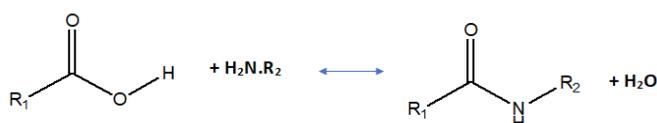
**Sistema Orgânico**

**ESTERIFICAÇÃO**

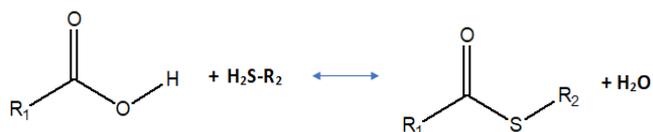
**Esterificação**



**Amidação**

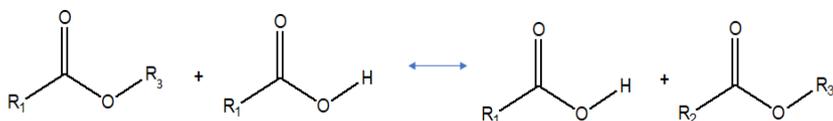


**Tio-esterificação**

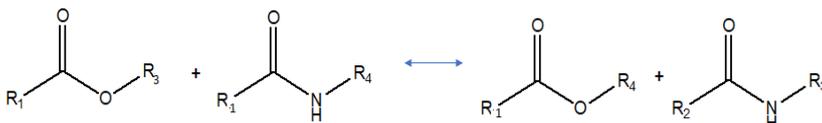


**TRANS-ESTERIFICAÇÃO**

**Reação de acidólise**



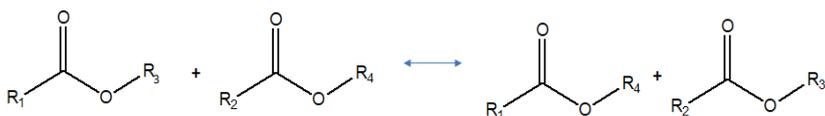
**Reação de aminólise**



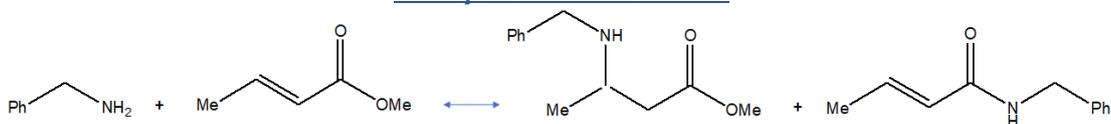
**Reação de alcoólise**



**Reação de inter-esterificação**



**REAÇÃO DE MICHAEL**



Todas as lipases aceitam ésteres de ácidos gordos de cadeia média (C4) e de cadeia longa (C16). Algumas lipases hidrolisam eficientemente ésteres de ácidos gordos com 22 carbonos, outras têm atividade de esterase, aceitando assim porções acetiladas mais curtas (Pleiss *et al.*, 1998). Em geral, há mais semelhanças entre lipases e esterases do que diferenças, pois ambas agem sobre o mesmo conjunto de substratos. No entanto, as esterases atuam em moléculas pequenas e triacilgliceróis de cadeia curta, enquanto as lipases atuam em triacilgliceróis de cadeia longa (Gaber, 2012).

Apesar do substrato natural das lipases ser triacilglicerol de ácidos gordos de cadeia longa, estas enzimas catalisam, também, a hidrólise de uma ampla gama de outros tipos de ésteres de ácidos gordos, embora as taxas de reação sejam geralmente menores (Macrae & Hammond, 1985).

Entre os biocatalisadores comercialmente disponíveis, os que são baseados em lipases são os mais utilizados, devido à notável versatilidade catalítica destas enzimas (Torres-Gavilán *et al.*, 2006). Cada aplicação realizada pelas lipases requer propriedades únicas em relação à especificidade, estabilidade, temperatura e dependência do pH (Fang *et al.*, 2006).

As aplicações mais relevantes destas enzimas estão relacionadas à indústria alimentar, ao fabrico de detergentes, à produção de surfatantes, à química orgânica (de modo a catalisar um grande número de transformações químio, regio e estereosseletivas), entre outras (Macrae & Hammond, 1985; Illanes, 2008; Seth *et al.*, 2014).

As lipases não são apenas atraentes como catalisadores para a modificação e síntese de compostos úteis, sendo também de uso potencial como componentes funcionais de misturas.

Uma das propriedades mais atraentes das lipases na síntese orgânica é a enantioselectividade e a enantiospecificidade. Há um grande número de produtos farmacêuticos que são moléculas quirais e apenas um dos seus enantiómeros é o princípio ativo (eutómero), sendo o outro (distómero) não funcional ou mesmo prejudicial. Portanto, há uma forte pressão, especialmente da indústria farmacêutica, para produzir medicamentos quirais como enantiómeros puros em oposição aos racematos (mistura de ambos os enantiómeros) produzidos por síntese química (Illanes, 2008).

Cataliticamente, as lipases pertencem ao grupo de enzimas serina hidrolases, que são caracterizadas por uma triada catalítica conservada formada por serina-histidina-aspartato (Ser-His-Asp). Dois grupos adicionais (Asp e His) localizados próximos do resíduo serina (que é o operador químico no site ativo) formam a chamada tríade catalítica. A disposição especial destes três grupos faz com que haja uma diminuição do pKa do grupo hidroxila serina, permitindo assim realizar um ataque nucleofílico no grupo carbonilo do substrato  $R^1-CO-OR^2$  (passo I - acilação). Assim, a porção acilo do substrato torna-se covalentemente ligada à enzima, formando o "intermediário acil-enzima" e libertando o grupo abandonante ( $R^2-OH$ ), que corresponde ao primeiro produto da reação. Em seguida, um nucleófilo, na Natureza a água, ataca o intermediário acil-enzima, regenerando a enzima e libertando um ácido carboxílico  $R^1-COOH$  (passo II – desacilação) (Figura 10) (Illanes, 2008; Faber, 2011; Gaber 2012; Adlercreutz, 2017; Pleiss *et al.*, 1998). O nucleófilo pode ser um álcool e, na ausência de água, forma-se um éster.

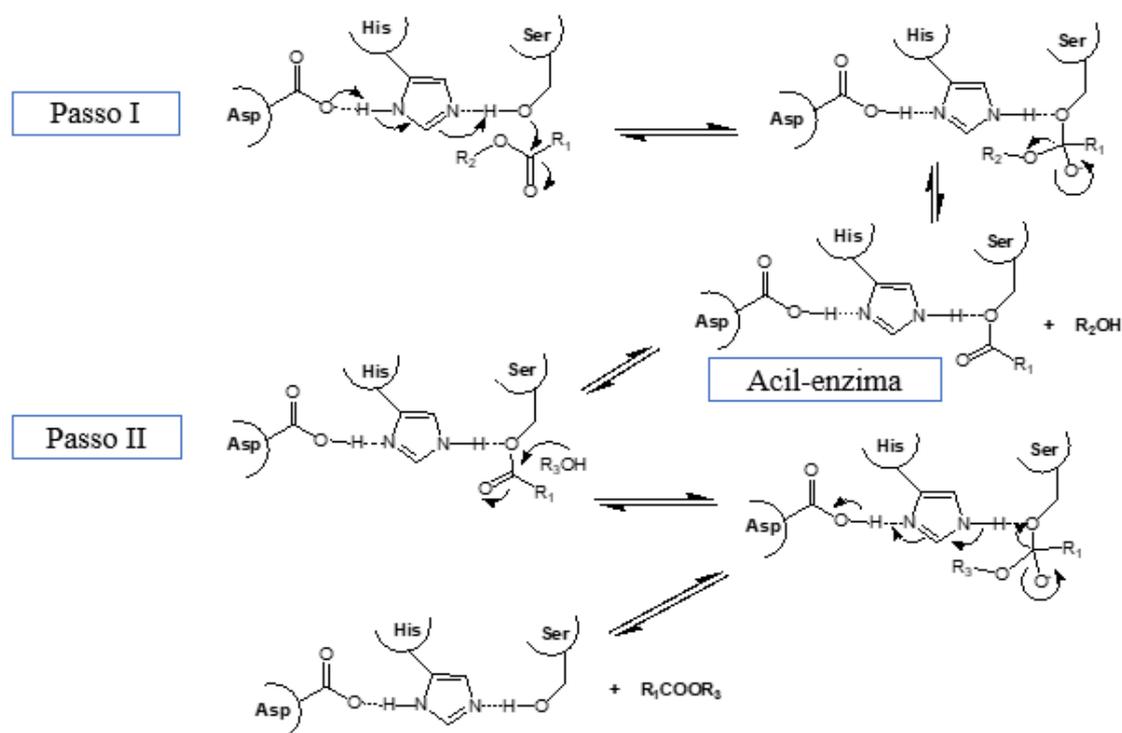


Figura 10 - Mecanismo catalítico das serina-hidrolases.

O efeito dos solventes nas lipases deve ser considerado na seleção das condições ótimas de reação, pois esta escolha afetará a atividade da enzima (Castillo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2010). Os efeitos do solvente usado na reação podem ser divididos em três categorias principais: (I) Alteração na conformação e / ou flexibilidade da enzima: a conformação e

flexibilidade de uma enzima são cruciais para uma catálise eficiente; (2) Mudanças na solubilidade; (3) Inibição competitiva: as moléculas do solvente ligam-se ao sítio ativo, onde atuam como inibidores competitivos do substrato (Graber *et al.*, 2007).

A estrutura e flexibilidade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) foram estudadas por Trodler & Pleiss (2008). Em solventes orgânicos, observou-se que a CALB é menos flexível no núcleo e no local ativo, com maior flexibilidade na superfície. A redução da flexibilidade da CALB em solventes não polares não é apenas uma consequência da interação entre as moléculas do solvente orgânico e a proteína, mas também devido à interação com a água ligada à enzima e a sua troca à superfície. Apesar da maior fluidez dos solventes orgânicos, a flexibilidade da CALB diminuiu, porque a troca de água à superfície é restrita. A flexibilidade diminuiu na seguinte ordem: metanol, isopentano, clorofórmio, tolueno e ciclohexano (Trodler & Pleiss, 2008).

A inibição competitiva do solvente foi estudada usando a CALB para a reação entre propanoato de metilo e 1-propanol, usando seis solventes orgânicos: 2-pentanona, 3-pentanona, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2-metilpentano e 3-metilpentano. Os resultados mostraram que as cetonas inibiram a atividade da enzima, enquanto que a presença de álcoois terciários e hidrocarbonetos não tiveram efeito negativo. Esta inibição competitiva explica parcialmente o efeito dos solventes na reação com lipases (Graber *et al.*, 2007).

Os sistemas aquosos são ótimos para as enzimas porque a água é o solvente primário na Natureza, permitindo que a enzima esteja na conformação ativa para a catálise. No entanto, a fim de catalisar as reações inversas da hidrólise (síntese de ésteres, amidas, etc.), um meio de reação com muito baixo teor de água é frequentemente necessário (Castillo *et al.*, 2015). Um sistema orgânico aumenta a solubilidade de substratos hidrofóbicos, melhora a termoestabilidade da enzima e desloca o equilíbrio termodinâmico para a síntese durante a hidrólise (Graber *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2015).

As lipases são caracterizadas pelo aumento da atividade na presença de uma interface aquosa/lipídica. Este aumento na atividade enzimática é desencadeado por rearranjos estruturais na região do local ativo da lipase (Faber 2011; Illanes, 2008). O sítio ativo da enzima é circundado por uma região muito hidrofóbica. Portanto, o substrato mais hidrofóbico terá maior afinidade por esta região e, portanto, sofrerá reações de esterificação com facilidade (Miller *et al.*, 1988).

Quando a lipase entra em contato com a interface de um sistema bifásico água / óleo, uma pequena hélice  $\alpha$ , designada de “tampa” é dobrada para trás. Assim, a molécula reorganiza-se, ficando no seu estado ativo, ou seja, a enzima passa da sua forma fechada para a sua forma aberta, expondo a sua superfície hidrofóbica e, permitindo a atividade catalítica (Faber 2011; Illanes, 2008).

A conformação fechada da lipase predomina em meios aquosos (como demonstrado pela baixa atividade das lipases em água), enquanto a conformação aberta da enzima é esperada em meio bifásico ou orgânico após ativação interfacial (Pleiss *et al.*, 1998; Cygler & Schrag, 1997). Para a lipase *Burkholderia cepacia* (BCL), simulações de dinâmica molecular mostraram que a lipase estava na sua conformação fechada em ambiente aquoso, havendo conversão espontânea da forma fechada para a forma aberta da lipase, num ambiente simulado de octanol / água, dentro de 20 nanossegundos (Barbe *et al.*, 2009).

A CALB é descrita como uma enzima promíscua, pois é capaz de catalisar diferentes tipos de reações, como esterificação, transesterificação, epoxidação, amidação, adição aldol e adição de Michael (Torres-Gavilán *et al.*, 2006; Gaber 2012). Semelhante a outras serina hidrolases, uma tríade catalítica de serina-histidina-aspartato é responsável pela atividade catalítica da CALB (Li *et al.*, 2010). A CALB é um catalisador eficiente para hidrólise em água e esterificação em solventes orgânicos. (Trodler & Pleiss, 2008). Aliás a CALB tem propriedades catalíticas interessantes em solventes orgânicos, pois a sua termoestabilidade e a estereosseletividade são alteradas favoravelmente (Trodler & Pleiss, 2008; Li *et al.*, 2010).

A CALB é usada em muitas aplicações industriais e em pesquisas científicas devido à sua alta enantiosseletividade, ampla gama de substratos, estabilidade térmica e estabilidade em solventes orgânicos (Trodler & Pleiss, 2008; Li *et al.*, 2010). Em contraste com a maioria das lipases, a CALB não possui uma “tampa” cobrindo a entrada do sítio ativo e não apresenta ativação interfacial (Trodler & Pleiss, 2008; Gaber 2012; Cygler & Schrag, 1997).

Em comparação com a água, os solventes orgânicos oferecem novas possibilidades na biocatálise. Em solventes orgânicos, as esterificações catalisadas por enzimas tornam-se viáveis, e podem ser eficientemente utilizadas devido à alta solubilidade de substratos hidrofóbicos. No entanto, em solventes orgânicos a atividade catalítica tende a ser menor do que em solventes aquosos, devido a algumas limitações como mudanças na flexibilidade da proteína ou desestabilização da enzima (Trodler & Pleiss, 2008).

Portanto, o que torna as lipases tão atraentes? Estas enzimas exibem excelente quimio-, regio- e estereosseletividade. Estão prontamente disponíveis em grandes quantidades porque muitas delas podem ser produzidas com elevados rendimentos a partir de organismos microbianos, nomeadamente fungos e bactérias e, geralmente, não exigem a presença cofatores. Estas propriedades fazem das lipases o grupo mais amplamente utilizado como biocatalizadores em química orgânica (Jaeger & Eggert 2002; Faber, 2011).

#### 1.2.4. Biocatálise em meio orgânico

A maioria das enzimas usadas como catalisadores em solventes orgânicos são as hidrolases, particularmente, lipases e proteases (Klibanov *et al.*, 1990; Grunwald, 2014). Para além da sua versatilidade catalítica, estas enzimas estão prontamente disponíveis comercialmente em quantidades consideráveis e a um custo relativamente baixo (Klibanov *et al.*, 1990).

A aplicação de hidrolases em meio de reação não convencional em escala laboratorial e industrial representa uma área de pesquisa e desenvolvimento ativos. As hidrolases são usadas principalmente para processos de resolução, onde um enantiómero de uma mistura racémica é seletivamente modificado de modo a produzir um derivado separável. Na água, estas enzimas catalisam a hidrólise de ésteres a fim de obter os álcoois e ácidos correspondentes, o que obviamente não pode ocorrer em meios quase anidros (Grunwald, 2014).

Na Natureza, as enzimas catalisam reações em solventes aquosos (Zaks & Klibanov, 1985; Goswami & Stewart, 2015). No entanto, o meio reacional aquoso para reações enzimáticas pode limitar as aplicações dos biocatalizadores. Duas razões óbvias subjacentes à necessidade de meios não aquosos são a baixa solubilidade em água de muitos substratos e o exigente processamento a jusante. Além disso, o uso de enzimas existentes em meios de reação não convencionais pode revelar atividades biocatalíticas inexploradas e, assim, ampliar o repertório de transformações catalisadas por enzimas (Grunwald, 2014).

A conformação nativa, cataliticamente ativa, das enzimas é mantida por um equilíbrio delicado entre várias interações não covalentes, participando a água em todas estas interações (Klibanov, 1989; Zaks & Klibanov, 1985). As enzimas necessitam de moléculas de água essenciais, uma vez que a remoção total de água pode distorcer drasticamente a

conformação da enzima e, assim prejudicar a atividade catalítica (Klibanov, 1989; Zaks & Klibanov, 1985; Goswami & Stewart, 2015).

Portanto, o principal fator que deve ser levado em consideração ao realizar a biocatálise em meio orgânico é o teor de água, pois este afeta a estabilidade das enzimas. A água, atuando com lubrificante, permite que as enzimas exibam a mobilidade conformacional necessária para uma catálise ótima (Stepankova *et al.*, 2013; Grunwald, 2014; Klibanov, 1997). Por outro lado, se o teor de água de um solvente orgânico exceder um certo limite, a tendência para que a enzima desnature é maior devido à maior mobilidade conformacional (Stepankova *et al.*, 2013; Grunwald, 2014).

A verdadeira questão não é se a água é realmente necessária, mas sim que quantidade de água é necessária para a atividade enzimática em meio orgânico. Desde que a água esteja localizada na superfície da enzima, denominada de camada de água “essencial”, o resto (ou seja, o volume) de água pode ser substituído por um solvente orgânico que imite a água e que não afete adversamente a enzima, por exemplo, glicerol ou etilenoglicol, que também podem formar múltiplas ligações de hidrogênio (Klibanov, 1989; Zaks & Klibanov, 1985; Klibanov, 1997). Como a quantidade absoluta de água contida na monocamada localizada na superfície da enzima é muito pequena, pode-se dizer que a enzima funciona em meio orgânico quase anidro (Klibanov, 1989; Zaks & Klibanov, 1985).

No que diz respeito à integridade estrutural, as enzimas são muito mais tolerantes aos solventes orgânicos hidrofóbicos do que aos hidrofílicos, uma vez que, os solventes hidrofílicos causam a desidratação prévia que altera a estrutura da enzima e reduz a atividade catalítica em sistemas quase anidros (Stepankova *et al.*, 2013; Klibanov, 1989; Grunwald, 2014).

Os solventes mais hidrofílicos, como o dioxano, o diclorometano e o clorofórmio retiram a camada de hidratação essencial presente na superfície da enzima e provocam a inativação enzimática. Por outro lado, solventes hidrofóbicos, como o ciclohexano, o n-hexano, o n-heptano e o isoctano, preservam a atividade catalítica. (Chowdary *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001). Portanto, pode-se verificar que atividade enzimática em solventes hidrofóbicos é maior do que em solventes hidrofílicos (Carrea & Riva, 2000).

Considera-se, então que, as enzimas são mais rígidas na ausência de água. Como consequência da rigidez da proteína, por um lado a enzima fica mais estável, por outro lado a maioria das enzimas apresenta menor eficiência catalítica em solventes orgânicos em comparação com soluções aquosas nativas devido à mobilidade conformacional restrita

(Stepankova *et al.*, 2013; Grunwald, 2014; Klibanov, 1997). Portanto, a alta estabilidade térmica das enzimas em meios orgânicos, especialmente em meios hidrofóbicos e com baixo teor de água, foi atribuída ao aumento da rigidez conformacional (Carrea & Riva, 2000).

Os solventes orgânicos não têm a capacidade como tem a água, de se envolverem em múltiplas ligações de hidrogénio (e, devido às suas constantes dielétricas mais baixas, levam a interações eletrostáticas mais fortes e, portanto, a proteína fica mais rígida (Klibanov, 1997). Além disso, a catálise enzimática em solventes orgânicos pode levar à inativação da enzima, referindo também que a preparação dos biocatalisadores é mais trabalhosa e dispendiosa (Goswami & Stewart, 2015; Grunwald, 2014).

A perda da atividade biocatalítica em solventes orgânicos é provocada pelos efeito cumulativo de vários parâmetros, tais como a constante dielétrica, as interações eletrostáticas, o momento dipolar, as ligações de hidrogénio e o valor de log P e de pH. Todos estes parâmetros influenciam a alteração e mobilidade conformacional da enzima (Grunwald, 2014; Klibanov, 1997; Khmelnitsky *et al.*, 1988)

No entanto, do ponto de vista biotecnológico, há inúmeras vantagens em realizar conversões enzimáticas em solventes orgânicos: potencial aumento da termoestabilidade e enantiosseletividade da enzima; alta solubilidade da maioria dos compostos orgânicos; capacidade de realizar novas reações impossíveis de realizar em meio aquoso devido a restrições cinéticas ou termodinâmicas; supressão de reações secundárias dependentes da água; maior estabilidade das enzimas; alteração do equilíbrio termodinâmico de modo a favorecer a síntese durante a hidrólise; relativa facilidade de recuperação do produto a partir de solventes orgânicos; e insolubilidade das enzimas, o que permite a sua fácil recuperação e reutilização e, assim, elimina a necessidade de imobilização enzimática (Zaks & Klibanov, 1985; Goswami & Stewart, 2015; Castro-Ochoa, *et al.*, 2005; Grunwald, 2014; Stepankova *et al.*, 2013; Guncheva *et al.*, 2011; Klibanov, 1997; Klibanov *et al.*, 1990; Danieli & Riva, 1994).

Uma vez que muitas lipases são ativas em solventes orgânicos, catalisando uma série de reações uteis (por exemplo, esterificação), verificou-se que estas enzimas têm características adequadas para a catálise em meio orgânico, pois apresentam conformação rígida e características de ativação interfacial (Chowdary *et al.*, 2000).

Geralmente, as lipases imobilizadas possuem excelente estabilidade em solventes orgânicos, por exemplo, a CALB imobilizada e a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada estão entre os biocatalisadores mais frequentemente utilizados em solventes não aquosos para síntese orgânica. Estas lipases foram amplamente utilizadas para a síntese orgânica em

solventes não aquosos, por possuírem excelente enantiosseletividade além da excelente estabilidade (Goswami & Stewart, 2015).

Toda e qualquer enzima deve funcionar em solventes orgânicos, desde que se encontrem as condições adequadas para que isso possa ocorrer (Zaks & Klivanov, 1985). A substituição de um solvente aquoso por um solvente não aquoso é de grande interesse biotecnológico, pois muitos processos enzimáticos praticamente impossíveis de realizar em água são prontamente realizados em solventes não aquosos (Klibanov, 1989).

A catálise enzimática em solventes orgânicos tornou-se um importante instrumento para a síntese orgânica (Carrea & Riva, 2000), uma vez que é uma abordagem extremamente útil para ampliar o campo de aplicações na biocatálise (Klibanov *et al.*, 1990; Grunwald, 2014).

### 1.2.5. Biocatálise no âmbito da Química verde

Uma maior conscientização para a proteção ambiental, ecologia industrial mais segura e tecnologias de produção mais limpas, fez com que houvesse um grande interesse pelos químicos para desenvolverem novos produtos, processos e serviços que alcancem o desenvolvimento social, económico e ambiental necessário (Sharma & Mudhoo, 2011).

Portanto, é amplamente reconhecido que existe uma necessidade crescente de processos ambientalmente mais aceitáveis na indústria química. Esta tendência que ficou conhecida como “química verde” ou tecnologia sustentável exige uma mudança de paradigma dos conceitos tradicionais de eficiência de processo, que se focam principalmente no rendimento químico (Sheldon *et al.*, 2007).

A química verde envolve a utilização de um conjunto de princípios que reduz ou elimina o uso ou a geração de substâncias perigosas no projeto, fabrico e aplicação de produtos químicos (Sharma & Mudhoo, 2011). Ou seja, é um conceito e princípio orientador que encoraja o desenvolvimento de processos de fabrico e produtos com o menor impacto ou pegada ambiental possível (Brahmachari, 2016; Tao & Kazlauskas, 2011), buscando integrar a prática de fabrico industrial com o mundo natural, um mundo biológico onde a sustentabilidade e a reciclagem são partes integrantes (Tao & Kazlauskas, 2011).

A química verde utiliza de forma eficiente matérias-primas (preferencialmente renováveis), elimina resíduos e evita o uso de reagentes e solventes tóxicos e / ou perigosos

no fabrico e na aplicação de produtos químicos (Patel, 2016; Sheldon et al., 2007). Além disso, para usar e produzir melhores produtos químicos com menos resíduos, a química verde envolve a redução de outros impactos ambientais associados, incluindo a redução da quantidade de energia usada em processos químicos (Sharma & Mudhoo, 2011; Sheldon et al., 2007).

A abordagem da química verde concentra-se na eliminação do desperdício na fonte, focando-se na prevenção primária da poluição em vez da remediação de resíduos (Patel, 2016; Sheldon et al., 2007), sendo considerada uma abordagem que evita a poluição e reduz o consumo de recursos (Tao & Kazlauskas, 2011).

A química verde não é diferente da química tradicional, na medida em que abrange a mesma criatividade e inovação que sempre foi central na química clássica (Sharma & Mudhoo, 2011).

Anastas & Warner (1998) desenvolveram "os doze princípios da química verde" (Figura 11), que são valiosas diretrizes de referência para os químicos e engenheiros no desenvolvimento e avaliação do quão verde é uma síntese, um composto, um processo ou uma tecnologia (Sharma & Mudhoo, 2011; Tao & Kazlauskas, 2011; Brahmachari, 2016), sendo o princípio orientador o *design* de produtos e processos ambientalmente benignos (Sheldon et al., 2007).



Figura 11 - Os doze princípios da química verde.

Considera-se que a biocatálise está em conformidade com os 10 dos 12 princípios da química verde, não sendo aplicável ao 4º e 10º princípios que dizem respeito à concepção de produtos mais seguros e biodegradáveis (Patel, 2016).

A biocatálise oferece numerosos benefícios no âmbito da química verde, uma vez que, as reações são conduzidas sob condições suaves empregando um catalisador que é biocompatível, biodegradável e derivado de recursos renováveis, evitando assim problemas de contaminação dos produtos associados ao uso de catalisadores de metal nobre. Além disso, os processos são económicos e altamente seletivos, resultando numa maior qualidade do produto e redução da geração de resíduos. É também de notar, que não são necessárias etapas de ativação, proteção e desproteção do grupo funcional necessárias na síntese orgânica tradicional (Patel, 2016; Tao & Kazlauskas, 2011). Portanto, pode-se dizer que os processos biocatalíticos são verdes e sustentáveis, ou seja, são mais atraentes para o meio ambiente e mais custo-efetivos em comparação aos processos químicos clássicos (Patel, 2016).

A biocatálise no âmbito da química verde e desenvolvimento de processos químicos dá uma visão geral de como a biotecnologia pode melhorar a pegada ambiental no fabrico de produtos químicos (Brahmachari, 2016).

Atualmente, cerca de 77 % de todos os produtos químicos são feitos de petróleo bruto, 10 % de gás natural, 2 % de carvão e 11 % de matérias-primas renováveis. Espera-se que esta relação mude no futuro com a expansão das economias baseadas na biologia para a produção não apenas de combustíveis, mas também de produtos químicos (Brahmachari, 2016).

Melhorar a eficiência do uso de matérias-primas, a reutilização de materiais reciclados, a geração e o uso de energia e continuar a desempenhar um papel de liderança no equilíbrio entre considerações ambientais e económicas são algumas das metas importantes para um desenvolvimento sustentável (Sheldon *et al.*, 2007). Pode-se dizer que o desenvolvimento sustentável é o objetivo final comum e a química verde é um meio para alcançá-lo (Patel, 2016).

### 1.2.6. Modulação da atividade biológica de compostos polifenólicos através de modificações estruturais

O uso de compostos polifenólicos em vários domínios é muito promissor mas também bastante limitado devido à sua fraca estabilidade e solubilidade em solventes orgânicos ou aquosos (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004; Mellou *et al.*, 2005; Fragopoulou *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2014). O interesse científico tem-se voltado para os derivados acilados, uma vez que o principal problema dos compostos fenólicos é a sua baixa biodisponibilidade, devido à sua baixa absorção e elevado metabolismo no fígado e intestino delgado, baixa solubilidade em água e outras características físico-químicas (Vlachogianni *et al.*, 2015). Portanto, a acilação destas moléculas melhora o seu carácter lipofílico, absorção e permeabilidade celular, de modo, a modular a sua atividade farmacêutica e / ou biodisponibilidade e assim, poder ser usada como uma ferramenta para melhorar as suas propriedades (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004; Mellou *et al.*, 2005; Vlachogianni *et al.*, 2015).

É de considerar a existência de compostos fenólicos acilados provenientes de fontes naturais. Foram detetadas em plantas as formas aciladas da quercetina, da apigenina, da luteolina, do tirosol e do resveratrol (Fragopoulou *et al.*, 2007). Mais especificamente, derivados acilados do resveratrol, foram detetados em extratos de *Calligonum leucocladum* (Vlachogianni *et al.*, 2015). Já as formas aciladas do tirosol foram encontradas em azeitonas pretas e no azeite (Fragopoulou *et al.*, 2007).

As reações de acilação podem ser realizadas por métodos químicos, enzimáticos ou quimio-enzimáticos (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004). Normalmente, os métodos semi-sintéticos são aplicados usando anidrido acético (Vlachogianni *et al.*, 2015) e enzimaticamente usando lipases ou transferases na presença de um dador de acilção adequado (Vlachogianni *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2014). Em particular, a acilação regioselectiva catalisada por lipases em solventes orgânicos tem sido bastante aplicada (Nicosoli *et al.*, 2002). É de salientar que a CALB tem sido utilizada de forma eficiente na acilação regioselectiva de compostos fenólicos (Teng *et al.*, 2004).

Aliás ao longo do tempo, vários estudos foram publicados sobre a acilação regioselectiva e bem sucedida de polifenóis, usando a CALB como catalisador, por exemplo, naringina (Kontogianni *et al.*, 2003), hesperidina (Ardhaoui *et al.*, 2004), rutina (Mellou *et al.*, 2005), isoquercitrina (Chebil *et al.*, 2007). Estes estudos utilizaram diferentes ácidos gordos como dadores de acilo e lipase CALB como biocatalisador, em meio não aquoso. Em todos

os casos, os monoésteres foram formados e a regioselectividade da reação foi constante, mostrando que a acilação ocorreu sempre no grupo hidroxilo primário presente na porção glicosídica da molécula (Kontogianni *et al.*, 2003; Ardhaoui *et al.*, 2004; Mellou *et al.*, 2005; Chebil *et al.*, 2007).

Mais especificamente, Castro *et al.* (2014) sintetizaram enzimaticamente, usando a CALB como catalisador e ácido palmítico como dador de acilo, derivados monoacilados da cianidina-3-glucósido e da delfinidina-3-glucósido, obtendo assim compostos mais hidrofóbicos, com maior interesse do ponto de visto tecno-funcional, uma vez que, são mais facilmente incorporados em formulações farmacêuticas, ampliando a sua gama de aplicações tecnológicas (Castro *et al.*, 2014).

A derivatização regioselectiva de compostos polifenólicos com base em reações químicas convencionais pode causar algumas dificuldades (Nicosoli *et al.*, 2002). Devido à natureza poli-hidroxilada dos polifenóis, a utilização de métodos químicos requer muitos passos de proteção / desproteção para se obter seletividade (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004). Além disso, os métodos químicos conduzem a uma mistura de produtos com diversos graus de esterificação, uma vez que estes métodos mostram uma regioselectividade baixa (Mellou *et al.*, 2005). Por estes motivos, a via enzimática, é por isso, mais regioselectiva, e por conseguinte, mais promissora (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2004).

A regioselectividade da reação depende principalmente da classe (primário, secundário, e fenólico) e das posições dos grupos hidroxilo disponíveis, sendo que a acilação ocorre preferencialmente no grupo hidroxilo primário (da glucose) (Chebil *et al.*, 2007). Ishihara & Nakajima *et al.* (2003) mostraram que a acilação enzimática da isoquercitina com ésteres vinílicos como dadores de acilo em acetona ou acetonitrilo como solvente, ocorreu no OH primário da porção de açúcar. Além disso, a introdução de um grupo acilo melhorou a termoestabilidade e a estabilidade à luz da isoquercitina (Ishihara & Nakajima, 2003).

A acilação enzimática seletiva de compostos poli-hidroxilados tornou-se cada vez mais popular devido à eficiência dos biocatalisadores e à elevada especificidade da enzima. A posição e o número da ligação dupla C-C na cadeia de acilo influenciam profundamente o comportamento da enzima, o que pode ser atribuído ao efeito de ressonância entre a ligação dupla e o grupo carbonilo. O efeito entre a ligação dupla e o grupo carbonilo pode reduzir a flexibilidade da cadeia alifática, tornando mais difícil que os dadores de acilo entrem no local ativo e formem os produtos desejados (Wang *et al.*, 2016 a).

A atividade biológica dos polifenóis depende do número e da posição dos seus grupos hidroxilo livres, sendo importante controlar a regioseletividade do processo de acilação, a fim de preservar os grupos hidroxilo responsáveis por essas atividades (Castro *et al.*, 2014). Portanto, de modo a manter a estrutura dos polifenóis durante as reações de acilação, deve ser dada especial atenção ao número, posições e tipos de substituição que ocorrem, a fim de preservar os efeitos biológicos observados. Para os glicósidos, a acilação ocorre na porção glicosilada, já no caso da aglicona, a substituição ocorre nos grupos hidroxilo dos anéis A, B e C (Chebil *et al.*, 2007).

Pode-se, então considerar que os grupos acilo parecem ser uma característica estrutural que modula a atividade biológica aos compostos fenólicos. Normalmente, os compostos fenólicos acilados exercem a mesma ou maior atividade biológica em comparação com o composto fenólico inicial. Por exemplo, no caso do resveratrol, os seus derivados acilados exercem maior atividade antioxidante e anti-trombótica do que o próprio resveratrol (Fragopoulou *et al.*, 2007; Vlachogianni *et al.*, 2015).

Vlachogianni *et al.*, (2015) compararam a atividade anti-oxidante do resveratrol e dos seus derivados acilados, sendo estudados o resveratrol, o 4' acetil-revesterol, o 3-acetil-resveratrol, o 3, 5-diacetil-resveratrol e o 3, 4'-diacetil-resveratrol. Estes compostos foram examinados por peroxidação lipídica não enzimática induzida por  $Fe^{2+}$ . O derivado diacilado na posição 3 e 5 mostrou uma inibição quatro vezes mais forte do que o resveratrol, enquanto que o 3-acetil-resveratrol parece apresentar maior atividade que o resveratrol. Os derivados monoacilados na posição 4' e o derivado diacilado na posição 3 e 4' apresentaram atividade inibidora mínima. Os resultados acima revelam a hipótese de que o grupo hidroxilo 4' na porção fenólica pode ser essencial para a atividade biológica ótima (Vlachogianni *et al.*, 2015).

A atividade anti-trombótica do resveratrol e dos seus derivados acilados foi estudada por Fragopoulou *et al.*, (2007) em plaquetas de coelho estimuladas com o fator ativador de plaquetas. Os resultados revelaram que apesar do derivado monoacilado do resveratrol apresentar atividade inibitória semelhante à do resveratrol, o derivado diacilado do resveratrol exerceu atividade inibitória mais potente do que a do próprio resveratrol, indicando que a entrada do segundo grupo acilo é capaz de melhorar a atividade anti trombótica do resveratrol (Fragopoulou *et al.*, 2007).

Salem *et al.* (2010) compararam a atividade anti-proliferativa da isoquercitina e dos seus derivados acilados. A reação de acilação foi catalizada pela CALB. As suas propriedades

anti-proliferativas foram investigadas em células cancerígenas Caco2, *in vitro*. Todos os ésteres de isoquercitina mostraram ser mais ativos do que o composto original, com valores de IC50 compreendidos entre 51 e 66  $\mu$ mol. Neste estudo, mostrou-se que a eficiência da síntese depende do comprimento do dador de acilo. A CALB exibiu uma atividade elevada em relação aos dadores de acilo de comprimento de cadeia curta e média e foi menos ativa em substratos de cadeia longa. É de notar que embora a molécula original fosse bastante inativa em relação às células do cancro de cólon humano Caco2, os seus ésteres sintetizados exibiram atividades antiproliferativas mais elevadas, indicando que estes novos compostos podem possuir propriedades antitumorais melhoradas (Salem *et al.*, 2010).

Iftitah *et al.* (2017) demonstraram que a lipase de *Rhizomucor miehei* catalisa, de forma eficiente, a acilação do álcool cíclico, o isopulegol. Os ésteres de isopulegol têm um grande interesse para a indústria alimentar como aromatizantes (Iftitah *et al.*, 2017).

A fim de produzir resveratrol a um preço razoável, a transformação da polidatina em resveratrol pode ser um procedimento viável. A aplicação de microorganismos imobilizados para a biotransformação do composto alvo foi levada à prática devido à alta especificidade e compatibilidade ambiental das enzimas (Jin *et al.*, 2013). Jin *et al.* (2013) investigaram a biotransformação do resveratrol em polidatina usando *Aspergillus niger* e levedura co-imobilizada. Após a biotransformação com *Aspergillus niger* e levedura co-imobilizada, abaixo de 30 °C, pH de 6,5, durante 2 dias, cerca de 96,7 % de polidatina foi transformada em resveratrol. O rendimento do resveratrol produzido atingiu 33,45 mg / g. Este processo pode ser uma alternativa competitiva e eficaz para a produção do resveratrol (Jin *et al.*, 2013).

Alguns flavonóides têm sido descritos como inibidores eficazes da xantina oxidase, uma enzima responsável pela produção de radicais superóxido, todavia a baixa absorção dos flavonóides *in vivo* é um fator limitante para sua biodisponibilidade (Araújo *et al.*, 2017). Araújo *et al.* (2017) estudaram o efeito dos derivados acilados de alguns flavonóides, entre eles, naringina, hesperidina e rutina na inibição da xantina oxidase. A reação de acilação foi realizada com os ácidos hexanoico, octanoico, decanoico, láurico e oleico e catalisada pela CALB. Houve um aumento considerável no efeito inibitório da atividade da xantina oxidase associado a três dos derivados acilados, naringinato de naringina, decanoato de naringina e decanoato de hesperidina. Os resultados sugerem que a síntese enzimática dos derivados acilados destes flavonóides, catalisada pela lipase CALB pode representar uma nova abordagem para a produção de inibidores competitivos da xantina oxidase. Assim, estes derivados acilados são candidatos promissores a serem utilizados em preparações

farmacêuticas, cosméticas e nutricionais para fins preventivos e / ou terapêuticos (Araújo *et al.*, 2017).

O uso de enzimas para a acilação seletiva de compostos poli-hidroxiados fornece uma alternativa útil aos métodos químicos clássicos, superando as desvantagens dos mesmos (Katsoura *et al.*, 2006; Mellou *et al.*, 2005). O desenvolvimento destes procedimentos enzimáticos permite a preparação de derivados bioativos cotendo diferentes grupos acilo em várias posições (Nicosoli *et al.*, 2002).

A acilação de produtos naturais pode ser importante, pois os grupos acílico aumentam a diversidade estrutural dos compostos naturais e também podem ser importantes para a sua bioatividade (Teng *et al.*, 2004).

Espera-se que a acilação seletiva dos polifenóis influencie as suas propriedades biológicas e farmacológicas e produza análogos que possam ser modelos úteis para o estudo das relações estrutura-atividade, em particular quanto às suas propriedades anfífilas e lipofílicas e, portanto, a sua capacidade de penetrar a membrana celular (Katsoura *et al.*, 2006; Nicosoli *et al.*, 2002; Fragopoulou *et al.*, 2007). De fato, a eficiência dos polifenóis como potenciais agentes terapêuticos pode estar relacionada às suas propriedades lipofílicas e, conseqüentemente, à sua capacidade de penetrar na célula (Nicosoli *et al.*, 2002).



## Capítulo II

# Objetivos



## 2. Objetivos

A modificação estrutural de compostos poli-hidroxilados, como a polidatina, requer condições suaves e seletividade. Está bem estabelecida a utilização das lipases em aplicações biocatalíticas, uma vez que além de outras vantagens, apresenta elevada regioselectividade. Sendo a polidatina um composto poli-hidroxilado, a biocatálise é o método mais eficaz para a sua acilação, pois as condições de reação são suaves e as etapas de proteção / desproteção dos grupos funcionais são desnecessárias. A polidatina contém na sua estrutura 6 grupos hidroxilo suscetíveis de sofrer acilação, logo, a regioselectividade das lipases é vantajosa para a obtenção de derivados acilados da polidatina.

De forma a melhorar as propriedades biológicas e farmacológicas da polidatina, este trabalho teve como objetivo geral a obtenção de derivados acilados da polidatina através de transformações biocatalíticas seletivas, recorrendo a lipases como biocatalisadores.

Neste trabalho, concretamente, pretende-se sintetizar, isolar e identificar estruturalmente os derivados acilados da polidatina, com atividades biológicas interessantes.

A introdução de dois grupos acilo diferentes na porção glicosídica da polidatina será explorada.



# Capítulo III

## Parte Experimental



## 3. Parte Experimental

### 3.1. Instrumentação

As reações enzimáticas foram realizadas num agitador orbital New Brunswick Scientific, C24 Incubator Shaker, a 40°C e 50°C, a 175 rpm.

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

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Büchi Melting Point B-540.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protões, RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 400, 400 MHz.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono,  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III de 100 MHz.

### 3.2. Cromatografia

A cromatografia de camada fina foi realizada em placas de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio, acetona e ácido acético (60:35:5).

### 3.3. Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente. O solvente usado nas reações enzimáticas, a acetona, foi obtido da Aldrich. A enzima utilizada, CALB foi adquirida à Aldrich. Os dados de acilo acetato de vinilo, cinamato de vinilo, propionato de vinilo e cinamato de vinilo foram obtidos da Aldrich.

### 3.4. Acilação enzimática da polidatina

#### 3.4.1. Síntese do 3'', 6'' - diacetato de polidatina (Composto 2)

Num frasco, adicionou-se 200 mg de polidatina, 3 mL de acetona, 1 mL de acetato de vinilo e 200 mg de CALB. A mistura reacional foi agitada a 175 rpm, a 40° C. Ao fim de 24 horas, a reação estava completa.

Posteriormente, procedeu-se à filtração da enzima e à evaporação do solvente com a ajuda de um evaporador rotativo. O produto obtido, o 3'', 6'' diacetato de polidatina (168 mg / 69,11 %) foi isolado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente clorofórmio, acetona e metanol numa proporção de 85: 10: 5, aumentando-se a polaridade ao longo da recolha dos tubos.

P.f.: 205,6 – 208,4 °C

#### 3.4.1.2. Síntese de 6'' - monocinamato de polidatina (Composto 3)

Num frasco, adicionou-se 200 mg de polidatina, 3 mL de acetona, 1 mL de cinamato de vinilo e 60 mg de CALB. A mistura reacional foi agitada a 175 rpm, a 40° C. Ao fim de 24 horas, a reação estava completa.

Posteriormente, procedeu-se à filtração da enzima e à evaporação do solvente com a ajuda de um evaporador rotativo. O produto obtido, o 6'' - monocinamato de polidatina (136 mg / 50,99 %) foi isolado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente clorofórmio, acetona e metanol numa proporção de 85: 10: 5, aumentando-se a polaridade ao longo da recolha dos tubos.

P.f.: 50,3 – 52,2 °C

#### 3.4.1.3. Síntese de 3'', 6'' - dipropionato de polidatina (Composto 4)

Num frasco adicionou-se 200 mg de polidatina, 3 mL de acetona, 1 mL de propionato de vinilo e 200 mg de CALB. A mistura reacional foi agitada a 175 rpm, a 40°C. A reação ficou completa ao fim de 24 horas.

Posteriormente, procedeu-se à filtração da enzima e à evaporação do solvente com a ajuda de um evaporador rotativo. O 3'', 6'' - dipropionato de polidatina (121 mg, 47,01 %) foi isolado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente diclorometano, acetona e metanol numa proporção de 87: 10: 3, aumentando-se a polaridade ao longo da recolha dos tubos.

P.f: 102,2 – 105°C

#### 3.4.1.4. Síntese de 6'' - monopropionato de polidatina (Composto 5)

Montou-se esta reação com o objetivo de, posteriormente, se conseguir alcançar o 6''- propionato, 3''- acetato. Num frasco adicionou-se 200 mg de polidatina, 3 mL de acetona, 0,7 mL de propionato de vinilo e 100 mg de CALB. A mistura reacional foi agitada a 175 rpm, a 40°C. A reação estava completa passado 4h.

Posteriormente, procedeu-se à filtração da enzima e à evaporação do solvente com a ajuda de um evaporador rotativo. O 6'' - monopropionato de polidatina (98 mg, 42,85 %) foi isolado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente clorofórmio, acetona e metanol numa proporção de 87: 10: 3, aumentando-se a polaridade ao longo da recolha dos tubos.

P.f: 172 – 173,8 °C

#### 3.4.1.5. Síntese de 6''- propionato, 3''- acetato de polidatina (Composto 6)

Num frasco adicionou-se 98 mg de monopropionato, 1 mL de acetona, 0,5 mL de acetato de vinilo e 75 mg de CALB. A mistura reacional foi agitada a 175 rpm, a 50 °C. A reação estava completa passado 4h.

Posteriormente, procedeu-se à filtração da enzima e à evaporação do solvente com a ajuda de um evaporador rotativo. O 6''- propionato, 3''- acetato de polidatina (39 mg, 36,38 %) foi isolado por cromatografia em coluna, usando-se como eluente diclorometano, acetona e metanol numa proporção de 87: 10: 3, aumentando-se a polaridade ao longo da recolha dos tubos.

P.f.: 107,3 – 109,5

Tabela 4 - Quadro síntese das reações realizadas ao longo deste trabalho.

Nº do composto	Polidatina (mg)	CALB (mg)	Acetona (mL)	Agente acilante	Volume de agente acilante (mL)	Derivado obtido	Peso do derivado obtido (mg)	Rendimento (%)
2	200	200	3	Acetato de vinilo	1	Diacetato de polidatina	168	69,11
3	200	60	3	Cinamato de vinilo	1	Monocinamato de polidatina	136	50,99
4	200	200	3	Propionato de vinilo	1	Dipropionato de polidatina	121	47,01
5	200	100	3	Propionato de vinilo	0,7	Monopropionato de vinilo	98	42,85

Tabela 5 - Quadro Síntese da nova reação realizada ao longo deste trabalho.

Nº do composto	6'' - propionato, 3'' - acetato de polidatina
Substrato	Monopropionato
Massa de substrato (mg)	75
Acetona (mL)	1
Agente acilante	Acetato de vinilo
Volume de agente acilante (mL)	0,5
Peso do derivado obtido (mg)	39
Rendimento (%)	36,38

# Capítulo IV

## Resultados e Discussão



## 4. Resultados e Discussão

O uso de compostos polifenólicos em vários domínios é muito promissor mas também bastante limitado devido à sua fraca estabilidade e solubilidade em solventes orgânicos ou aquosos (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004; Mellou *et al.*, 2005; Fragopoulou *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2014). Recentemente, o interesse científico voltou-se para os derivados acilados, uma vez que o principal problema dos compostos fenólicos é a sua baixa biodisponibilidade (Vlachogianni *et al.*, 2015).

Devido à natureza poli-hidroxilada dos polifenóis, a utilização de métodos químicos requer muitos passos de proteção / desproteção para se obter alguma seletividade (Chebil *et al.*, 2007; Ardhaoui *et al.*, 2004). Além disso, os métodos químicos conduzem a uma mistura de produtos com diversos graus de esterificação, uma vez que estes métodos mostram uma regioselectividade baixa (Mellou *et al.*, 2005). Como as enzimas são altamente seletivas, a catálise enzimática não requer etapas de proteção e desproteção dos grupos funcionais (Patel, 2016; Tao & Kazlauskas, 2011). Além disso, a atividade enzimática em condições suaves é um atributo valioso para a produção de compostos poli-hidroxilados, como é o caso dos compostos polifenólicos (Illanes *et al.*, 2012; Bommarius & Riebel, 2004).

Por estes motivos e acrescentando a necessidade de processos ambientalmente mais aceitáveis na indústria química, a acilação da polidatina foi realizada a partir de métodos enzimáticos.

### 4.1. Definição das condições de acilação da polidatina

Neste trabalho, optou-se pela utilização da lipase como biocatalisador para a acilação enzimática da polidatina, devido às vantagens que estas enzimas detêm, pois além de possuírem excelente quimio-, regio- e estereosseletividade, são bastante versáteis e estáveis, estão prontamente disponíveis comercialmente e, geralmente, não exigem a presença de co-fatores.

De entre as lipases disponíveis, optou-se pela utilização da CALB para catalisar a acilação enzimática da polidatina, uma vez que em ensaios de screening, realizados por grupos anteriores, variando o solvente e o dador de acilo, aplicando a CALB e a lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS), e a polidatina, como substrato, verificou-se que ambas as enzimas são biocatalisadores adequados para a acilação da polidatina no entanto a lipase CALB é mais

rápida na acilação deste composto do que a lipase PS. Por esta razão a lipase CALB foi escolhida para a acilação enzimática deste composto.

Nos ensaios de screening acima referidos verificou-se que a acetona, o acetato de etilo e a etilmetilcetona são solventes mais adequados para a CALB. Optou-se pela utilização da acetona como solvente.

É de notar que acilação enzimática em meios não aquosos é muito atraente, uma vez que se caracteriza por ser bastante eficiente e altamente seletiva. Além disso, os efeitos colaterais derivados da presença da água são evitados e o isolamento do produto é mais fácil (Zaks & Klibanov, 1985; Goswami & Stewart, 2015; Castro-Ochoa, *et al.*, 2005; Grunwald, 2014; Stepankova *et al.*, 2013; Guncheva *et al.*, 2011; Klibanov, 1997; Klibanov *et al.*, 1990; Danieli & Riva, 1994).

## 4.2. Acilação enzimática da polidatina

A polidatina (3, 4', 5-tri-hidroxiestilbeno-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo) a forma glicosilada do resveratrol (Ding *et al.*, 2014), é um composto monocristalino natural isolado da raiz e rizoma de uma planta medicinal tradicional chinesa *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc (Polygonaceae), uma planta com valor medicinal e nutricional (Xu *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016a; Le *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2017; Ling *et al.*, 2016). Está presente na nossa alimentação diária, sendo detetada em uvas, amendoins, vinho tinto e produtos que contêm cacau (Kuo *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016 a; Lv *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2017). Este composto recebeu especial atenção, por demonstrar múltiplas atividades farmacológicas benéficas. Além de proteger as células do miocárdio, prevenir a agregação plaquetária e melhorar a microcirculação, este composto apresenta também atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-angiogénica (Du *et al.*, 2013).

Como demonstrado na figura 12, a polidatina é constituída 6 grupos hidroxilo (1 primário, 2 fenólicos e 3 secundários), suscetíveis de sofrer acilação.

O grupo hidroxilo primário na posição 6'' da polidatina é o grupo hidroxilo menos estericamente impedido, seguido do grupo hidroxilo secundário na posição 3''. Assim, considera-se que a região 6'' da polidatina é a primeira posição a sofrer acilação, dando origem ao derivado monoacilado. A segunda posição de acilação da polidatina é a região 3'' resultando no derivado diacilado.

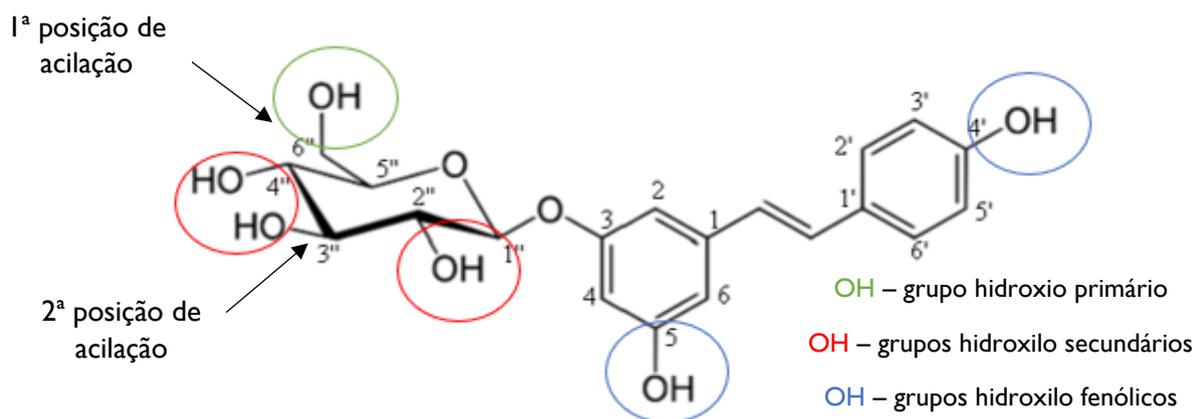


Figura 12 - Estrutura química da polidatina, com identificação dos grupos hidroxilo primário, fenólicos e secundários, e posições de acilação.

Foram obtidos 6 derivados da polidatina, usando a CALB como biocatalisador, acetona como solvente e acetato de vinilo, propionato de vinilo e cinamato de vinilo como agentes acilantes.

Para a confirmação estrutural do produto da reacção de acilação da polidatina com CALB e acetato de vinilo, procedeu-se à purificação do mesmo através de cromatografia em coluna e à análise por RMN unidimensional, juntamente com o substrato de partida, a polidatina, para efeitos de comparação.

O espectro RMN  $^1\text{H}$  da polidatina (Figura 13) indica a presença dos hidrogénios ligados a carbonos aromáticos: dois dubletos a  $\delta\text{H}$  7,49 ppm (2H, d,  $J=8$  Hz, H-2' e H-6') e  $\delta\text{H}$  6,75 ppm (2H, d,  $J=8$  Hz) e três singuletos a  $\delta\text{H}$  6,72 ppm,  $\delta\text{H}$  6,56 ppm e  $\delta\text{H}$  6,33 que correspondem aos hidrogénios H-2, H-6 e H-4, respectivamente. Verifica-se a presença dos sinais característicos dos hidrogénios ligados à olefina, que correspondem a dois dubletos a  $\delta\text{H}$  7,03 (1H, d,  $J=16$  Hz, H-b) e  $\delta\text{H}$  (1H, d,  $J=16$  Hz, H-a). A presença dos hidrogénios dos grupos OH foi detectada como dois singuletos a  $\delta\text{H}$  9,55 ppm atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo ligado ao carbono C-4' e  $\delta\text{H}$  9,41 ppm atribuído ao hidrogénio do grupo hidroxilo ligado ao carbono C-5, e três dubletos a  $\delta\text{H}$  5,26 ppm,  $\delta\text{H}$  5,06 ppm e  $\delta\text{H}$  5,00 ppm. Os hidrogénios ligados aos carbonos da glucose correspondem ao multiplete a  $\delta\text{H}$  3,07-3,57 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6'').

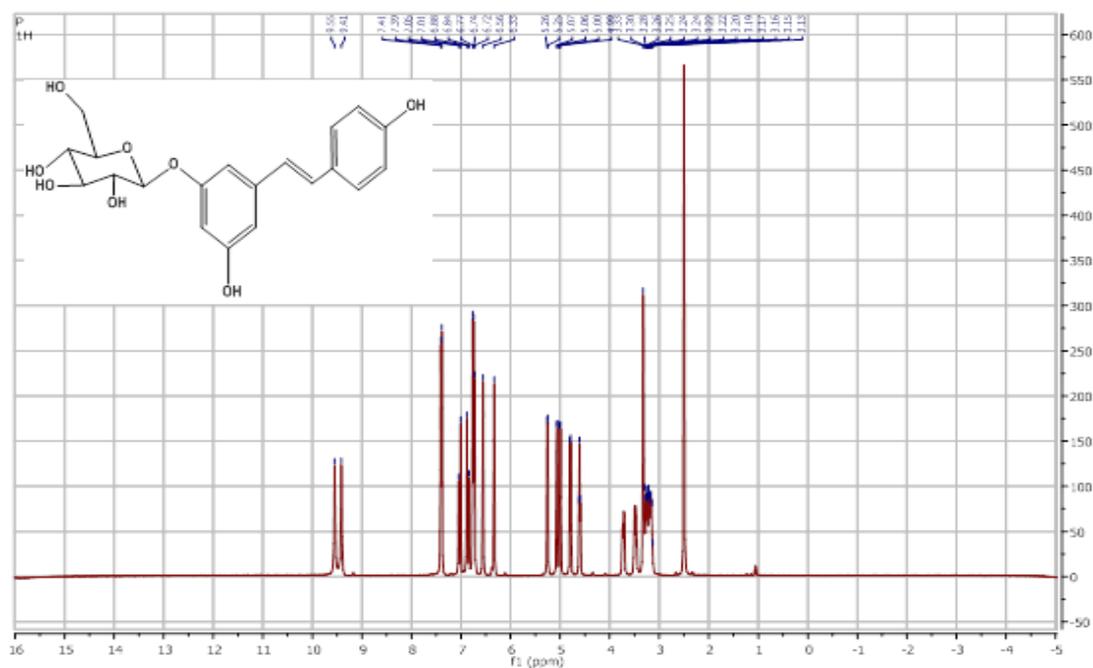


Figura 13 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da polidatina.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da polidatina (Figura 14) fornece os desvios dos 20 carbonos da estrutura da polidatina: 158,88 ppm (C-3); 158,34 ppm (C-5); 157,30 ppm (C-4'); 139,34 ppm (C-1); 128,53 (C-1'); 127,98 ppm (C- $\beta$ ); 127,92 ppm (C-2'e C-6'); 125,22 (C- $\alpha$ ); 115,51 ppm (C-3'e C-5'); 107,17 ppm (C-6); 104,75 (C-4); 102,75 (C-2); 100,68 (C-1''); 77,13 (C-5''); 76,70 (C-3''); 73,28 (C-2''); 69,77 (C-4''); 60,72 (C-6'').

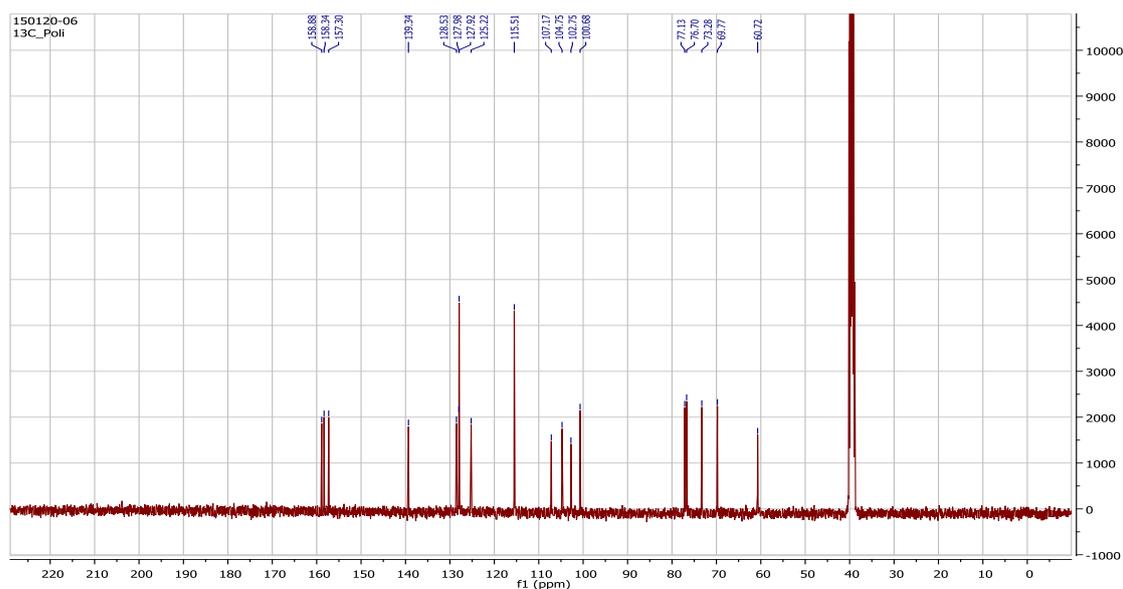


Figura 14 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da polidatina.

A reação de acilação da polidatina com acetato de vinilo forneceu um único produto. Na análise do espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto obtido (Figura 15), verificou-se o aparecimento de dois sinais novos a  $\delta\text{H}$  5,54 ppm (dd, 2H,  $J=4$  Hz, H-6'') e  $\delta\text{H}$  4,91 ppm (t, 1H,  $J_1=8$  Hz,  $J_2=12$  Hz, H-2'') que correspondem à primeira e segunda posição de acilação, respectivamente. Observou-se também a entrada de dois singletos a  $\delta\text{H}$  1,96 ppm (3H), e  $\delta\text{H}$  2,05 (3H) característicos de grupos metílicos dos grupos acetato.

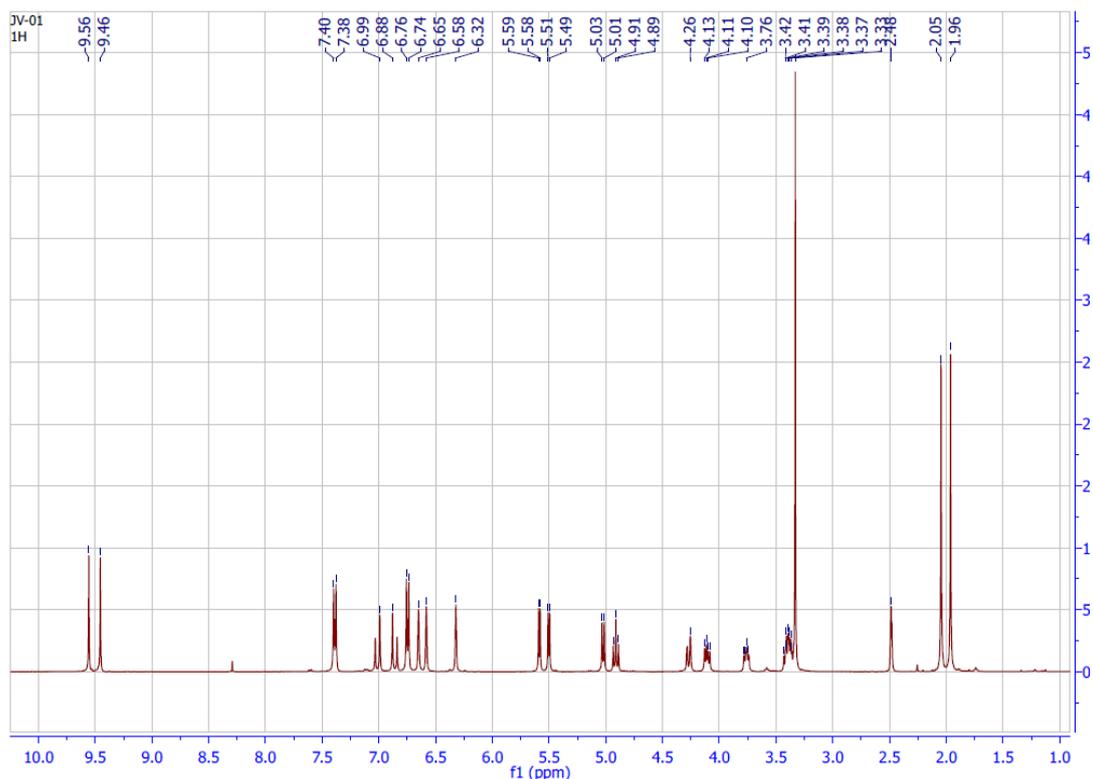


Figura 15 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto de reação de acilação enzimática da polidatina com o acetato de vinilo.

Na análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do produto da acilação enzimática da polidatina com acetato de vinilo (Figura 16), observou-se o aparecimento de dois sinais a 20,50 ppm e 21,08 ppm referentes a carbonos metílicos, e de dois sinais a 169,10 ppm e 170,18 ppm relativos a carbonos de grupos carbonilo. O sinal a 63,04 ppm atribuído ao C-6 da glucose sofreu uma alteração na ordem dos 2,32 ppm comparativamente à molécula da polidatina ( $\delta$  60,72 ppm). Além disso, o sinal atribuído ao C-3 da glucose ( $\delta$  71,04 ppm) sofreu uma alteração significativa na ordem dos 5,63 ppm quando comparado com o substrato de

partida ( $\delta$  76,70 ppm). Esses dados sugerem a presença de ligações éster nas posições C-6 e C-3 da glucose, confirmando assim as posições de acilação.

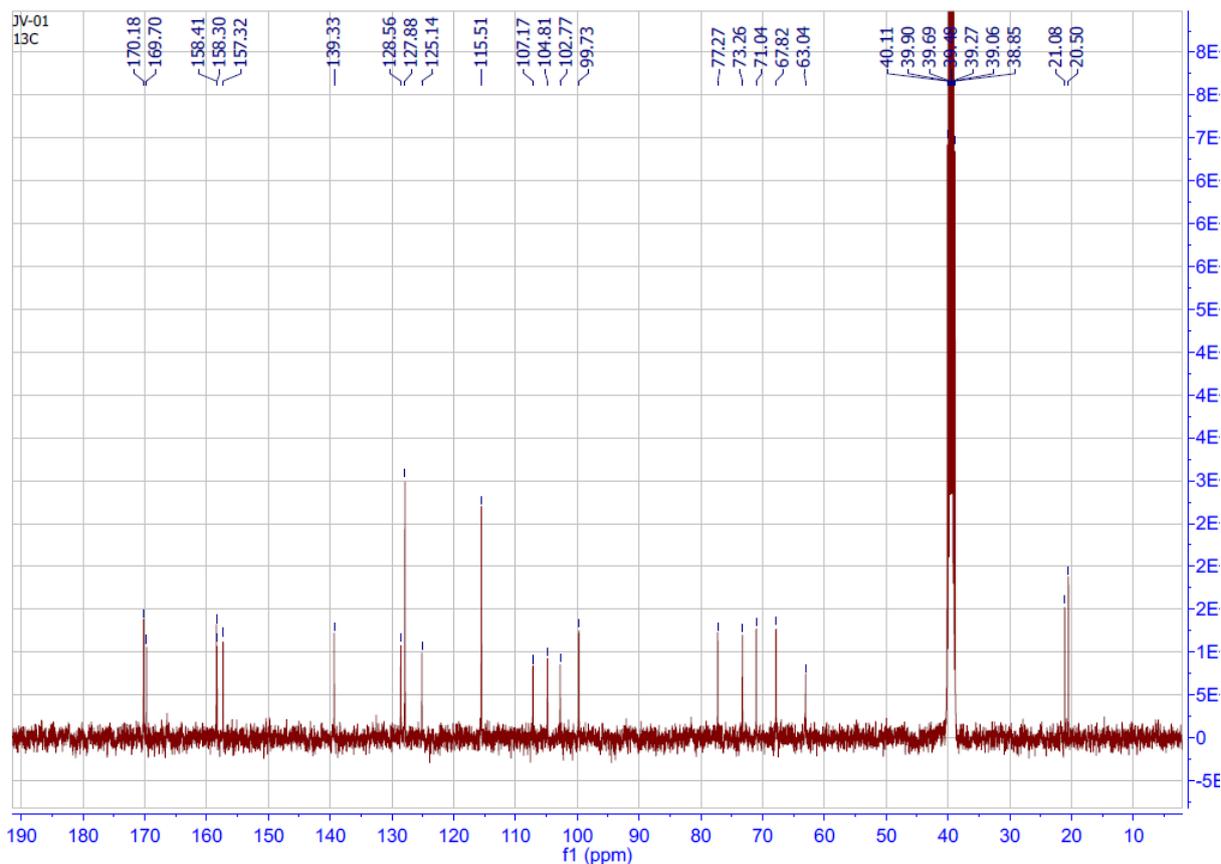


Figura 16 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com acetato de vinilo.

De facto, os dados sugeridos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  sugerem a presença de ligações éster nas posições C-6'' e C-3'', confirmando as posições de acilação. Dada a confirmação da estrutura do produto de reacção (Composto 2), a representação esquemática da reacção pode ser ilustrada na Figura 17.

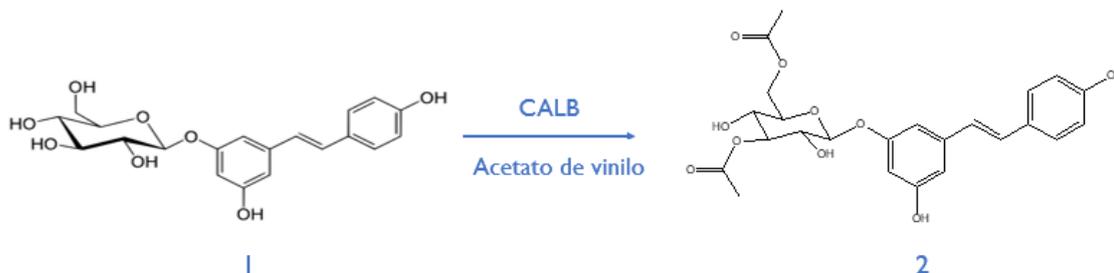


Figura 17 - Reacção de diacilação da polidatina, utilizando acetato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.

A reação da polidatina com cinamato de vinilo na presença de CALB conduziu à formação de um único produto. O espectro RMN  $^1\text{H}$  de polidatina (Figura 18) indica a presença dos hidrogénios dos grupos OH fenólicos inalterados, tendo sido detectados como dois singletos a  $\delta_{\text{H}}$  10.0 e 9.90 ppm. A presença dos hidrogénios ligados a carbonos aromáticos: dois dubletos a  $\delta_{\text{H}}$  7,49 ppm (2H, d,  $J=8$  Hz, H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,75 ppm (2H, d,  $J=8$  Hz) e três singletos a  $\delta_{\text{H}}$  6,72 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  6,56 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  6,33 que correspondem aos hidrogénios H-2, H-6 e H-4, respectivamente e os multipletos correspondentes ao anel aromático do cinamato. A presença dos hidrogénios ligados aos carbonos da glucose que correspondem ao multiplete a  $\delta_{\text{H}}$  3,50-4.2.

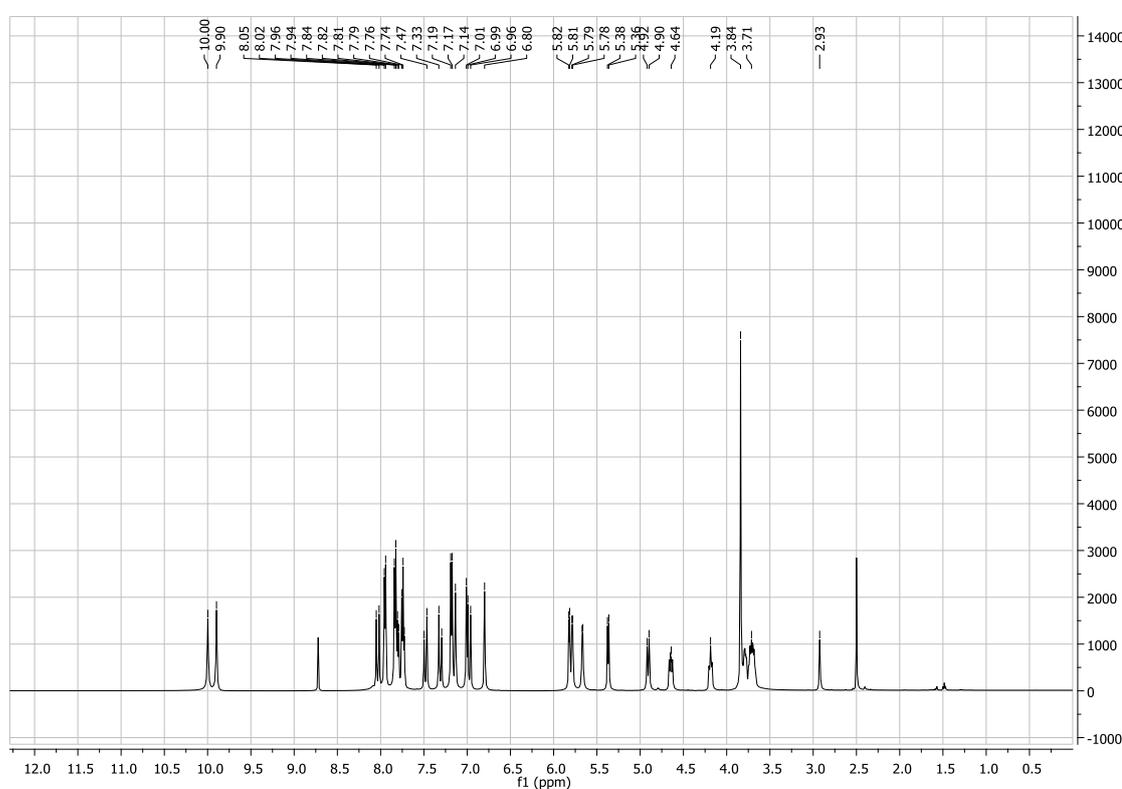


Figura 18 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o cinamato de vinilo.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cinamato de polidatina (Figura 19) fornece os desvios dos 29 carbonos da estrutura do derivado, com destaque para o sinal a 166,25 ppm correspondente ao grupo carbonilo.

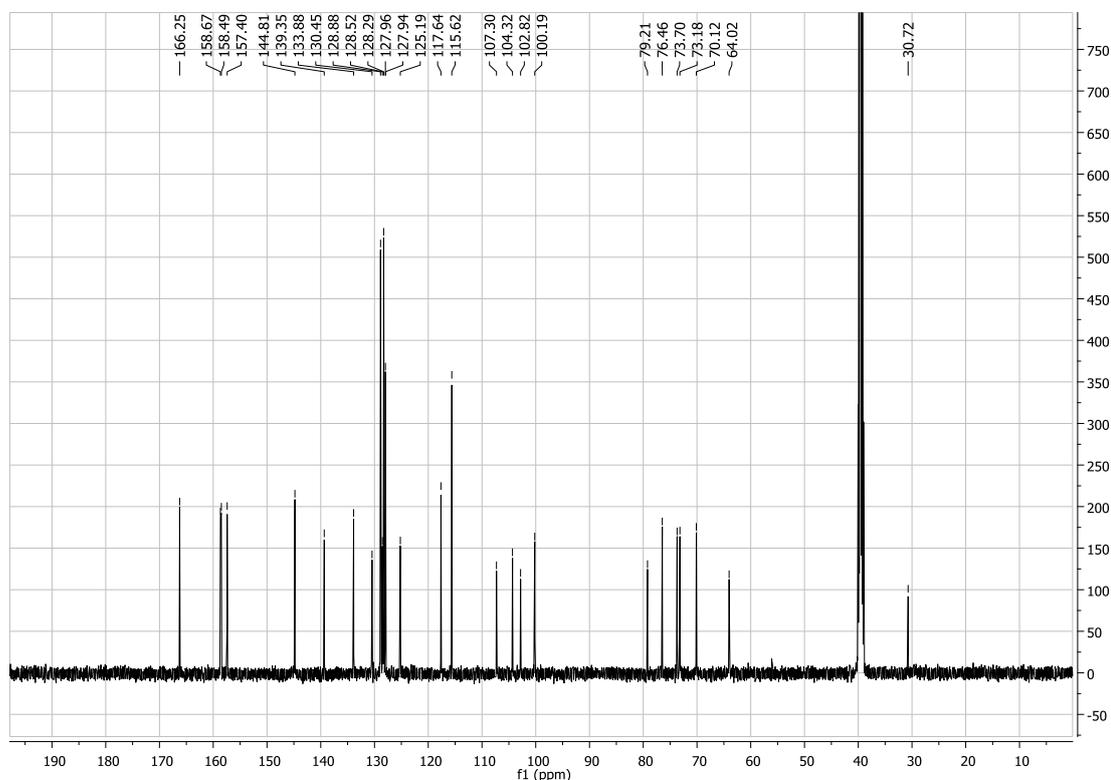


Figura 19 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com cinamato de vinilo.

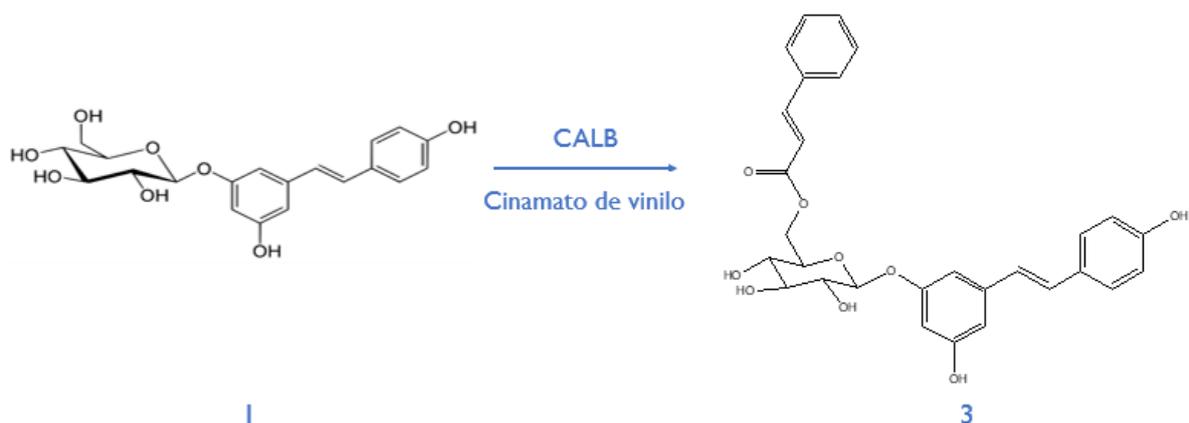


Figura 20 - Reacção de monoacilação da polidatina, utilizando cinamato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.

A reacção da polidatina com propionato de vinilo de vinilo na presença de CALB conduziu à formação de dois produtos, um com maior factor de retenção na placa cromatográfica (Composto 4) e um com menor factor de retenção (Composto 5), cuja proporção pode ser modulada através da modificação das condições reaccionais.

O espectro RMN  $^1\text{H}$  do 3'',6''- dipropionato de polidatina, Composto 4, (Figura 21) indica a presença dos hidrogénios dos grupos OH fenólicos inalterados, tendo sido detectados como dois singuletos a  $\delta_{\text{H}}$  9,58 e 9,47 ppm. A presença dos hidrogénios ligados a carbonos aromáticos: dois dubletos a  $\delta_{\text{H}}$  7,41 ppm (2H, d,  $J=8$  Hz, H-2'e H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,77 ppm (2H, d,  $J=8$  Hz) e três singuletos a  $\delta_{\text{H}}$  6,67 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  6,60 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  6,33 que correspondem aos hidrogénios H-2, H-6 e H-4, respectivamente. A presença dos hidrogénios ligados aos carbonos da glucose que correspondem ao multipletto a  $\delta_{\text{H}}$  3,30-3,5 ppm. A presença de dois grupos propionato são evidenciados pelo aparecimento de dois tripletos a 0,95 e a 1,07 com integração 3 correspondentes aos hidrogénios metílicos e a dois multipletos a 2,25 e 2,34 ppm correspondentes aos hidrogénios metilénicos do grupo propionato.

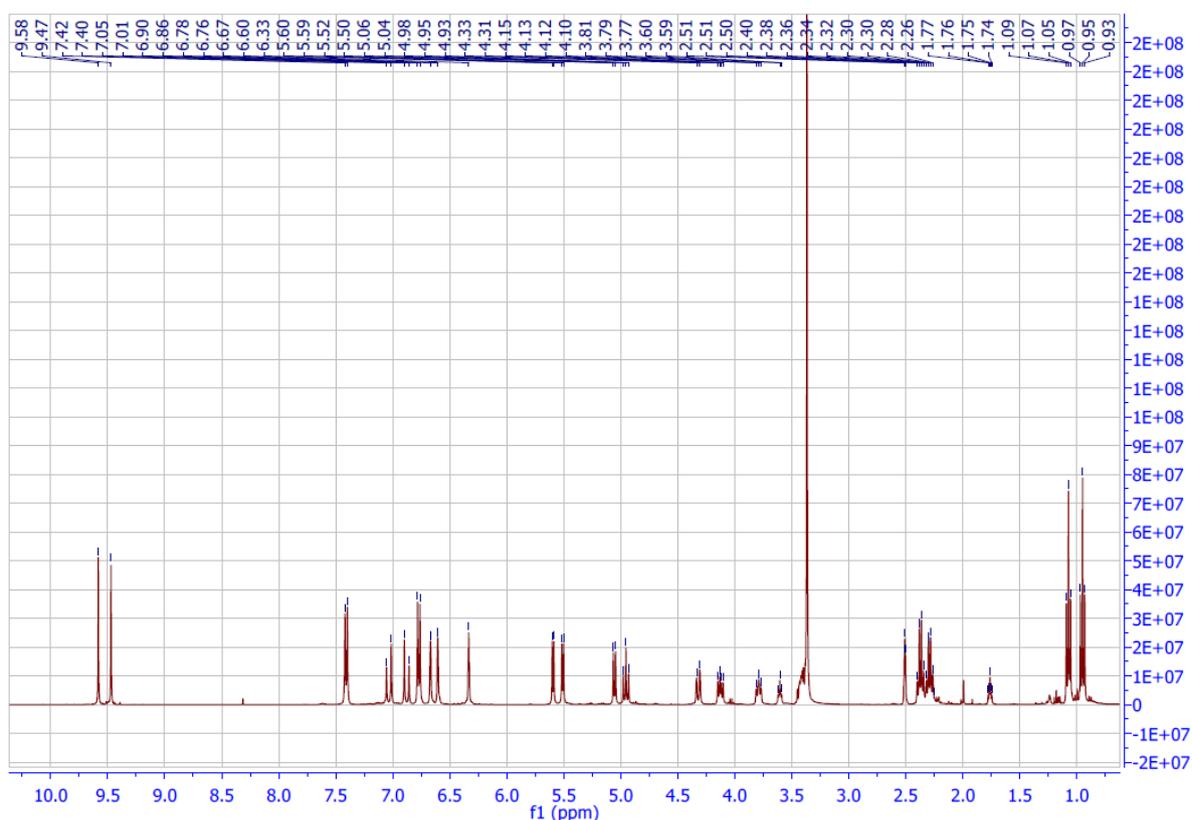


Figura 21 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 3'',6''-dipropionato de polidatina (figura 22) fornece os desvios dos 26 carbonos da estrutura do derivado, com destaque para os sinais a 173,04 e 173,45 ppm correspondentes aos grupos carbonilo.

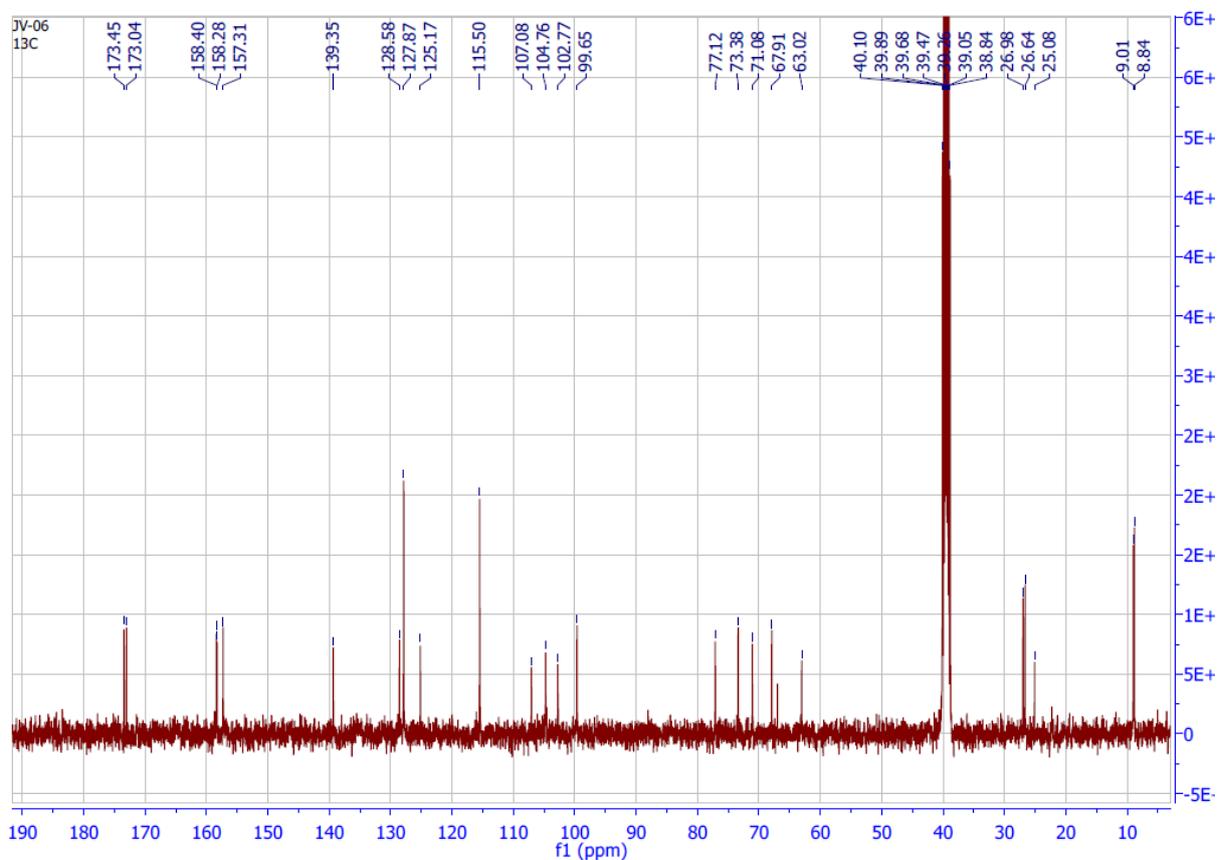


Figura 22 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.

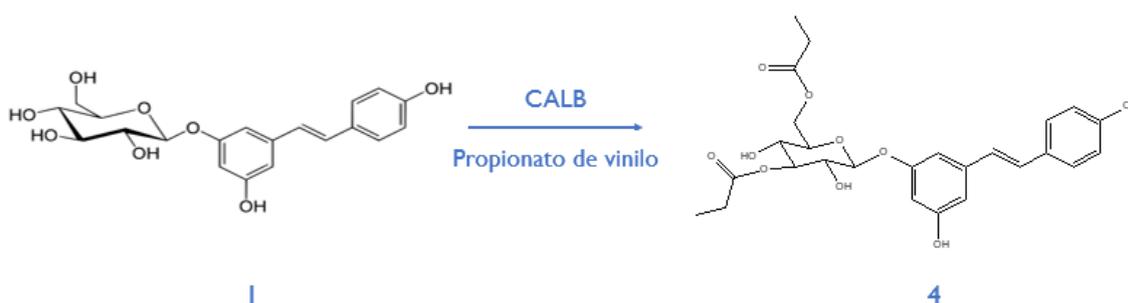


Figura 23 - Reacção de diacilação da polidatina, utilizando propionato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.

O espectro RMN  $^1\text{H}$  do 6''- propionato de polidatina, Composto 5, (Figura 24) indica a presença de um grupo propionato evidenciados pelo aparecimento de um tripuleto a 0,93 com integração 3 correspondente aos hidrogénios metílicos e de um multiplete a 2,27 ppm correspondente aos hidrogénios metilénicos do grupo propionato.

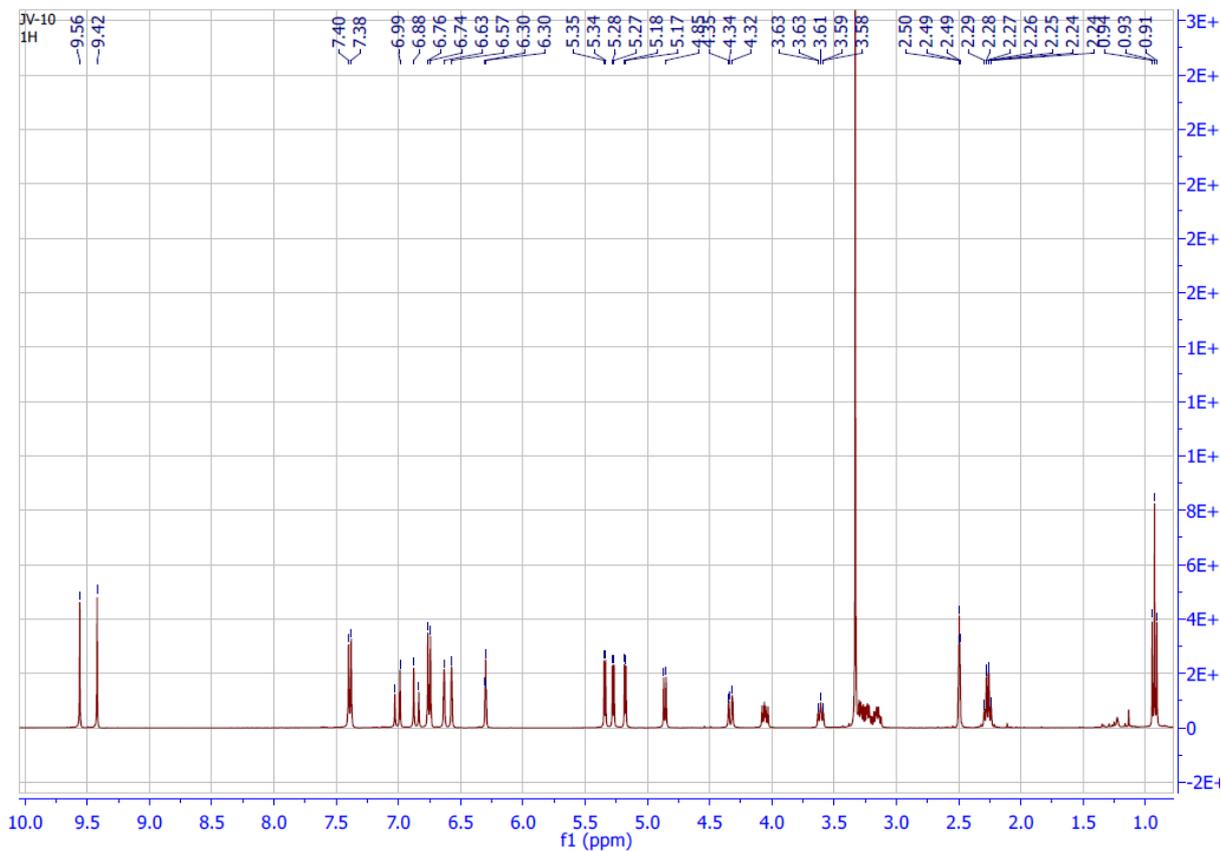


Figura 24 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 6''- propionato de polidatina (Figura 25) fornece os desvios dos 23 carbonos da estrutura do derivado, com destaque para os sinais a 173,47 ppm correspondente aos grupos carbonilo.

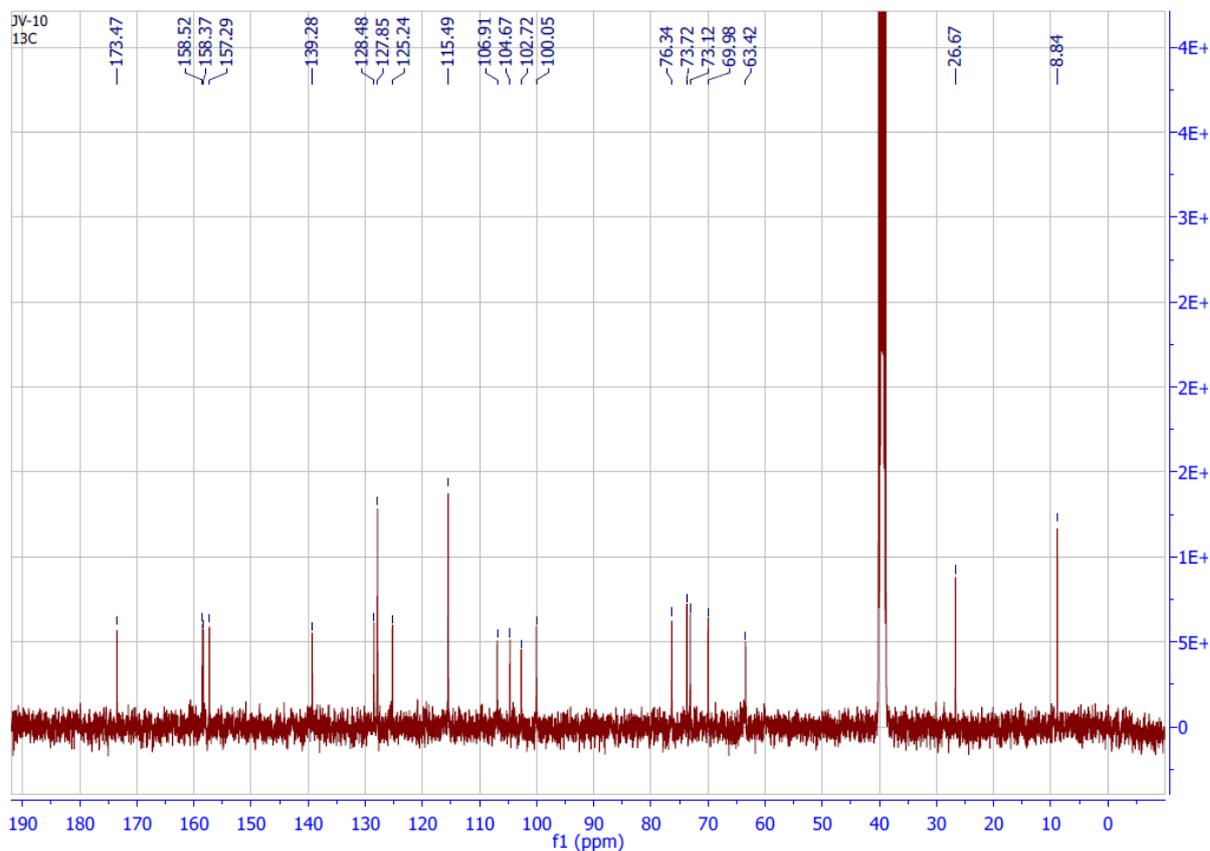


Figura 25 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do produto de reação de acilação enzimática da polidatina com o propionato de vinilo.

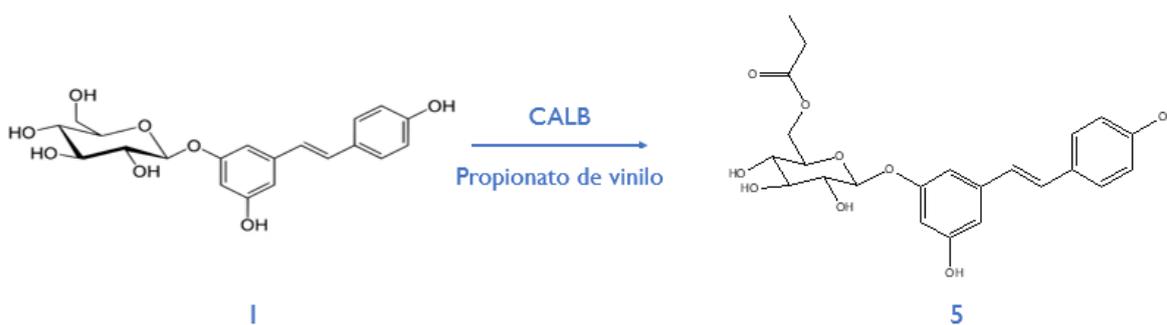


Figura 26 - Reação de acilação da polidatina, utilizando propionato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.

A reação do 6''- propionato de polidatina com acetato de vinilo na presença de CALB forneceu um único produto, o 6''-propionato,3''-acetato de polidatina, Composto 6, (Figura 27). No espectro de  $^1\text{H}$  RMN destaca-se a presença de um triplete a 0,95 ppm e um multipletto a 2,51 ppm correspondentes aos hidrogénios metílicos e metilénicos, respectivamente, do grupo propionato. Além disso, destaca-se a presença de um singuleto a 2,07 ppm correspondente aos hidrogénios metílicos do grupo acetato.

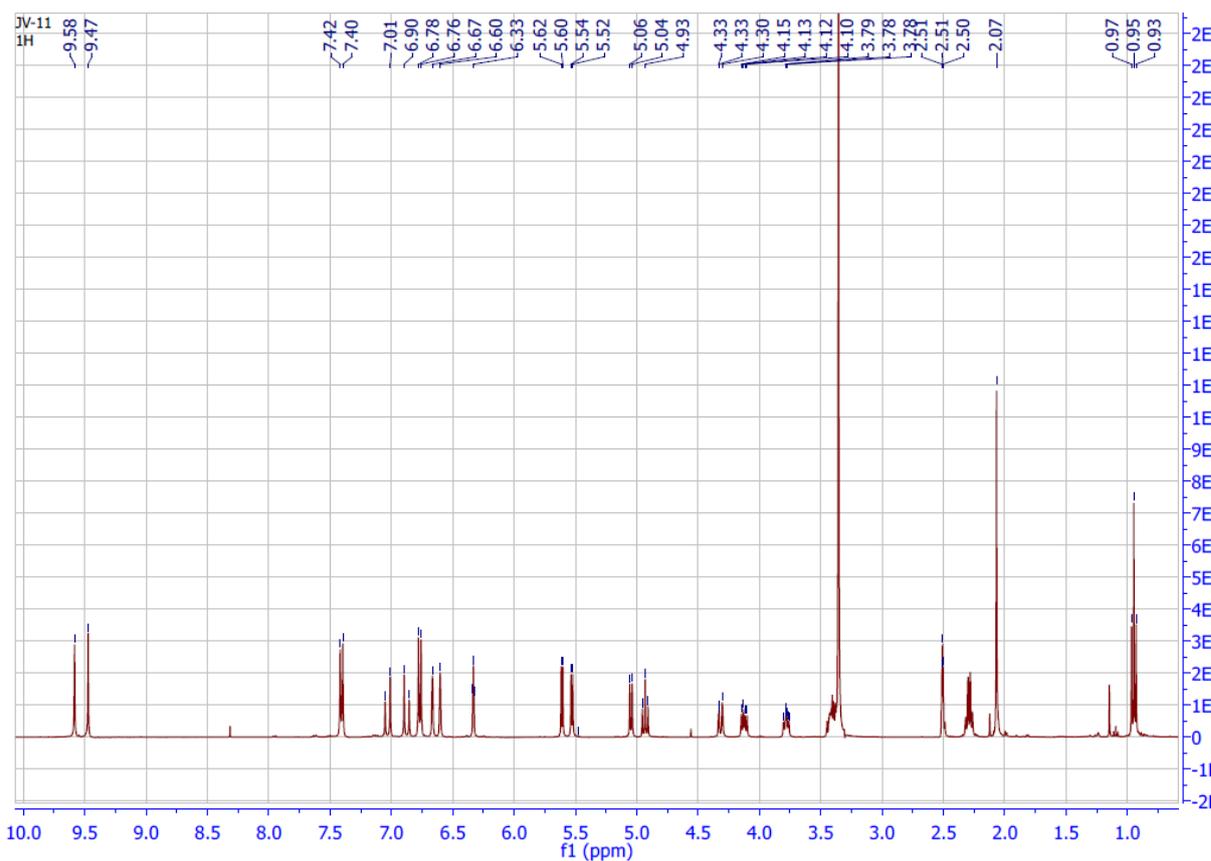


Figura 27 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o acetato de vinilo.

No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 28) destacam-se dois picos a 169,69 e 173,44 ppm correspondentes aos dois grupos carbonilo.

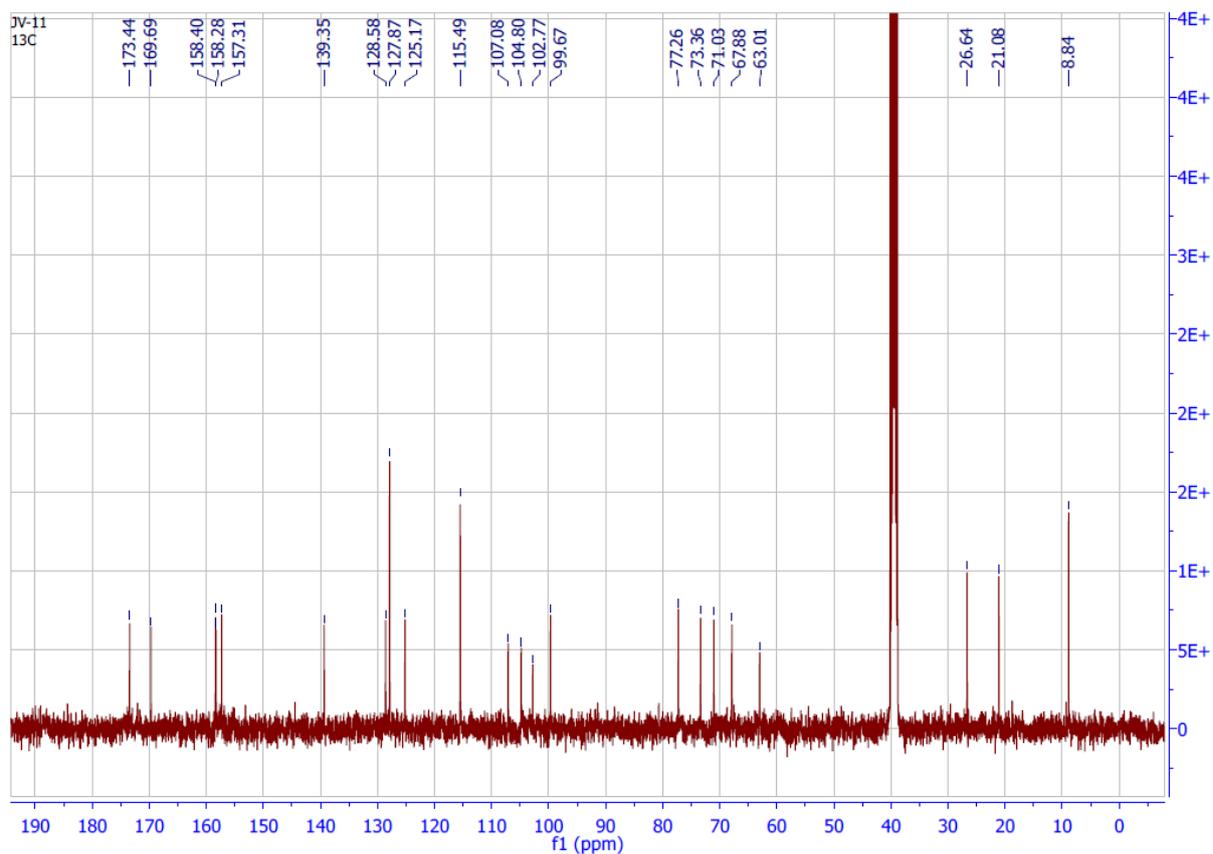


Figura 28 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do produto de reacção de acilação enzimática da polidatina com o acetato de vinilo.

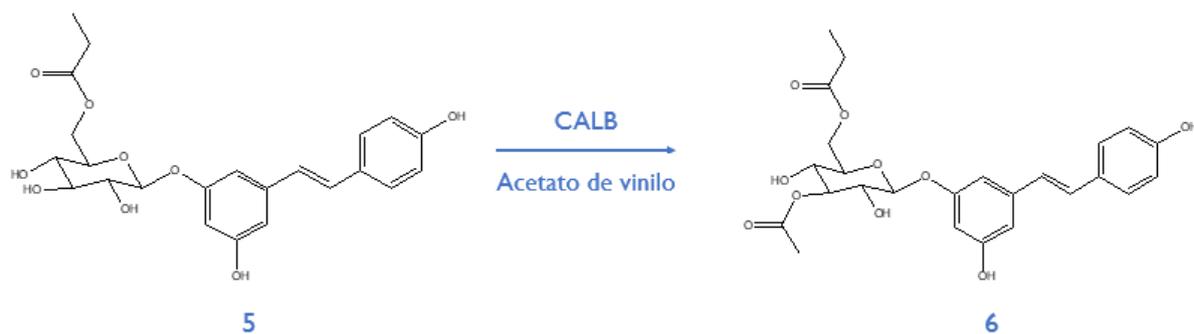


Figura 29 - Reacção de acilação do derivado 6'' - monopropionato da polidatina com inserção do acetato na posição 3'', utilizando acetato de vinilo como agente acilante e a lipase CALB como biocatalisador.

# Capítulo V

## Conclusão



## 5. Conclusão

Os compostos fenólicos têm recebido atenção considerável devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas interessantes para a saúde humana. São moléculas biologicamente ativas distribuídas por todo o reino vegetal.

É amplamente reconhecida a necessidade crescente de processos ambientalmente mais aceitáveis na indústria química. A modificação estrutural de compostos polifenólicos por via enzimática insere-se neste contexto, onde os processos são verdes e sustentáveis mais atraentes para o meio ambiente e mais custo-efetivos em comparação com os processos químicos clássicos.

Note-se que como polidatina é constituída por 6 grupos hidroxilo suscetíveis de ser acilados, a especificidade da reação é extremamente desejável. Assim, a biocatálise parece ser o método mais promissor para a obtenção de derivados acilados da polidatina, uma vez que as enzimas têm capacidade de reconhecer e diferenciar os diferentes grupos hidroxilo da polidatina.

Efetuuou-se, neste estudo, reações de acilação enzimática da polidatina, em meio orgânico, utilizando a CALB como biocatalisador.

Os resultados mostraram a capacidade da lipase CALB em reconhecer e diferenciar os diferentes grupos hidroxilo, uma vez que foram obtidos regioselectivamente derivados mono- e diacilados com bons rendimentos. A obtenção primeiramente de um derivado monoacilado na posição 6'' da porção glicosídica da polidatina, sugere que a lipase CALB têm preferência pelos grupos hidroxilos primários. Seguidamente, de modo a formar o derivado diacilado, a lipase CALB dirige a acilação para a posição 3'' da polidatina.

É de salientar que se conseguiu introduzir dois grupos acilos diferentes na porção glicosídica da polidatina, resultando no 6''- propionato, 3''- acetato de polidatina.

Conclui-se com este estudo a utilidade da biocatálise na acilação regioselectiva da polidatina. A biocatálise permitiu a modificação estrutural da polidatina, com a obtenção de derivados mono- e diacilados, de modo a obter novos compostos com actividades biológicas que serão exploradas oportunamente.



**Referências  
Bibliográficas**



## 6. Referências Bibliográficas

- Abdulhameed, S., Pradeep, N. & Sugathan, S. (2017). *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*. Springer.
- Acerson, M. J. & Andrus, M. B. (2014). Selective esterification of the polyphenol resveratrol at the 4' - position. *Tetrahedron Letters*, 55 (3), 757-760. Doi: 10.1016/j.tetlet.2013.12.019.
- Adlercreutz, P. (2017). Comparison of lipases and glycoside hydrolases as catalysts in synthesis reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (2), 513-519. Doi: 10.1007/s00253-016-8055-x.
- Akarca, O., Ocal, O., Bulduk, E. B., Pasaoglu, O. T, Gundogdu, et al. (2017). Protective effects of resveratrol in a rat model of ischemia-reperfusion injury of sciatic nerve. *Gazi Medical Journal*, 28 (4), 260-265.
- Anastas, P. T. & Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: theory and practice*. Oxford University Press.
- Araújo, M. E. M. B., Franco, Y. E. M., Alberto, T. G., Messias, M. C. F., Leme, et al. (2017). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by acylated derivatives of flavonoids synthesised enzymatically. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32 (1), 978-985. Doi: 10.1080/14756366.2017.1347165.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J. M., Moussou, et al. (2004). Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29 (1-6), 63-67. Doi: 10.1016/j.molcatb.2004.02.013.
- Arora, A., Nair, M. G. & Strasburg, G. M. (1998). Antioxidant Activities of Isoflavones and Their Biological Metabolites in a Liposomal System. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356 (2), 133-141. Doi: 10.1006/abbi.1998.0783.
- Artero, A., Artero, A., Tarín, J. J. & Cano, A. (2015). The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*, 80 (1), 3-13. Doi: 10.1016/j.maturitas.2014.09.007.
- Athar, M., Back, J. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R. & Kim, A. L. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 486 (2), 95-102. Doi: 10.1016/j.abb.2009.01.018.

- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (1), 191-203. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- Baltz, R. H., Demain, A. L. & Davies, J. E. (2010). *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, Capítulo 33. 3ª edição, American Society for Microbiology Press.
- Barbayanni, E. & Kokotos, G. (2012). Biocatalyzed Regio- and Chemoselective Ester Cleavage: Synthesis of Bioactive Molecules. *ChemCatChem*, 4 (5), 592-608. Doi: 10.1002/cctc.201200035.
- Barbe, S., Lafaquière, V., Guineynesse, D., Monsan, et al. (2009). Insights into lid movements of Burkholderia cepacia lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins*, 77(3), 509-523. Doi: 10.1002/prot.22462.
- Basholli-Salihi, M., Schuster, R., Mulla, D., Praznik, et al. (2016). Bioconversion of polidatina to resveratrol by selected probiotic cell extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (12), 1879-1885. Doi: 10.1007/s00449-016-1662-1.
- Biasutto, L., Marotta, E., Bradaschia, A., Fallica, M., Mattarei, et al. (2009). Soluble polyphenols: Synthesis and bioavailability of 3,4',5-tri( $\alpha$ -D-glucose-3-O-succinyl) resveratrol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19 (23), 6721-6724. Doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.114.
- Bommarius, A. S. & Riebel, B. R. (2004). *Biocatalysis*. Capítulo 1. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Borgdorf, R. & Warwel, S. (1999). Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis - and trans-9-octadecenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51 (4), 480-485. Doi: 10.1007/s002530051420.
- Bouayed, J. (2012). *Nutrition, well-being and health*. Capítulo 2. IntechOpen.
- Boyce, S. & Tipton, K. F. (2015). Enzyme Classification and Nomenclature and Biocatalytic Retrosynthesis. *Biocatalysis in Organic Synthesis 1*, 41-74. Doi: 10.1055/sos-SD-214-00028.
- Brahmachari, G. (2016). *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Capítulo 14. Academic Press.
- Burkon, A. & Somoza, V. (2008). Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - Two

novel resveratrol metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52 (5), 549-557. Doi: 10.1002/mnfr.200700290.

Cai, J., Guan, Z. & He, y. (2011). The lipase-catalyzed asymmetric C–C Michael addition. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(3-4), 240-244. Doi: 10.1016/j.molcatb.2010.11.011.

Camont, L., Cottart, C. H., Rhayem, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, et al. (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 634 (1), 121-128. Doi: 10.1016/j.aca.2008.12.003.

Cao, K., Lei, X., Liu, H., Zhao, H., Guo, J., Chen, et al. (2017). Polydatin alleviated radiation-induced lung injury through activation of Sirt3 and inhibition of epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21 (12), 3264-3276. Doi: 10.1111/jcmm.13230.

Carrea, G. & Riva, S. (2000). Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie*, 39, 2226-2254. Doi: 10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2226::AID-ANIE2226>3.0.CO;2-L

Castillo, E., Casas-Godoy, L. & Sandoval, G. (2015). Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis*, 1 (1), 178-188. Doi: 10.1515/boca-2015-0013.

Castro, V. C., Silva, P. H. A., Oliveira, E. B., Desobry, S. & Humeau, C. (2014). Extraction, identification and enzymatic synthesis of acylated derivatives of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, 49 (1), 196-204. Doi: 10.1111/ijfs.12298.

Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G. & Oliart Ros, R. (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (6), 648-654. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.003.

Chan, C. N., Trinité, B. & Levy, D. N. (2017). Potent inhibition of HIV-1 replication in resting CD4 T Cells by resveratrol and pterostilbene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61 (9). Doi: 10.1128/AAC.00408-17.

Chang, S., Fornasiero, P., Gunnoe, T. B., Jones, C. W., Linic, et al. (2016). ACS Catalysis and the Scope of Papers Sought in Three Catalysis Subdisciplines: Biocatalysis and Enzymology, Molecular Catalysis for Organic Synthesis, and Heterogeneous Photocatalysis. *ACS Catalysis*, 6 (7), 4782-4785. Doi: 10.1021/acscatal.6b01749.

Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, et al. (2007). Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (23), 9496-9502. Doi: 10.1021/jf071943j.

Chen, L., Lan, Z., Lin, Q., Mi, X., He, Y., Wei, et al. (2013). Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 28-35. Doi: 10.1016/j.fct.2012.10.037.

Cheng, W., Yu, P., Wang, L., Shen, C., Song, et al. (2015). Sonic hedgehog signaling mediates resveratrol to increase proliferation of neural stem cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35 (5), 2019-2032. Doi: 10.1159/000374009.

Choudhry, Z., Rikani, A. A., Choudhry, A. M., Tariq, S., Zakaria, et al. (2014). Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Annals of neurosciences*, 21 (1), 28–31. Doi: 10.5214/ans.0972.7531.210109.

Cichewicz, R. H. & Kouzi, S. A. (2002). Resveratrol oligomers: Structure, chemistry, and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26 (1), 507-579.

Clemens, M. R. & Waller, H. D. (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2 (4), 251-268. Doi: 10.1016/0009-3084(87)90068-5.

Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J. C., Solary, et al. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 124 (12), 2780-2788. Doi: 10.1002/ijc.24264.

Croft, K. D (2016). Dietary polyphenols: Antioxidants or not?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 120-124. Doi: 10.1016/j.abb.2015.11.014.

Cui, Q., Fu, Q., Zhao, X., Song, X., Yu, J., Yang, et al. (2018). Protective effects and immunomodulation on piglets infected with rotavirus following resveratrol supplementation. *PLOS ONE* 13 (2), 1-11. Doi: 10.1371/journal.pone.0192692.

Cvejic, J. M., Djekic, S. V., Petrovic, A. V., Atanackovic, et al. (2010). Determination of trans- and cis-resveratrol in Serbian commercial wines. *Journal of Chromatographic Science*, 48 (3), 229-234. Doi: 10.1093/chromsci/48.3.229.

Cycler, M. & Schrag, J. D. (1997). Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods in Enzymology*, 284 (1992), 3-27. Doi: 10.1016/S0076-6879(97)84003-7.

Danieli, B. & Riva, S. (1994). Polyhydroxylated Natural Products. *Pure and Applied Chemistry* 66 (10-11), 2215-2218. Doi: 10.1351/pac199466102215.

Das, S., Lin, H. S., Ho, P. C. & Ng, K. Y. (2008). The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharmaceutical Research*, 25 (11), 2593-2600. Doi: 10.1007/s11095-008-9677-1.

De Maria, S., Scognamiglio, I., Lombardi, A., Amodio, N., Caraglia, et al. (2013). Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and differentiation of human colorectal Caco-2 cell. *Journal of Translational Medicine*, 11 (1). Doi: 10.1186/1479-5876-11-264.

Dekic, S., Vljevic, S. M., Vajs, V., Jovic, et al. (2008). Trans- and cis-resveratrol concentration in wines produced in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73 (11), 1027-1037. Doi: 10.2298/JSC0811027D.

Ding, X., Hou, X., Gao, S., Sun, et al. (2014). Pharmacokinetics and bioavailability study of polydatin in rat plasma by using a LC-MS/MS method. *Pak J Pharm Sci*, 27 (6), 1931-1937.

Dordick, J. S. (2013). Biocatalysts for industry. Capítulo I. Springer Science & Business Media.

Du, J., Sun, L. N., Xing, W. W., Hunag, et al. (2009). Lipid-lowering effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* in hyperlipidemic hamsters. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16 (6-7), 652-658. Doi: 10.1016/j.phymed.2008.10.001.

Du, Q., Peng, C. & Zhang, H. (2013). Polydatin: A review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical Biology*, 51 (11), 1347-1354. Doi:10.3109/13880209.2013.792849.

Espín, J. C. & Wichers, H. J. (2000). Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *Journal of Food Biochemistry*, 24 (3), 225-250. Doi: 10.1111/j.1745-4514.2000.tb00698.x.

Faber, K. (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. Capítulo 1, 2 e 3. 6ª edição, Springer Science & Business Media.

Faber, K.; Fessner, W. & Turner, N. (2015). *Biocatalysis in Organic Synthesis*, volume 1. Thieme Chemistry.

Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G. & Stevanato, R. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and polidatina on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry*, 135 (1-3), 76-83. Doi: 10.1016/j.bpc.2008.03.005.

Fang, J. G., Lu, M., Chen, Z. H., Zhu, H. H., Li, et al. (2002). Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chemistry - A European Journal*, 8 (18), 4191-4198. Doi: 10.1002/1521-3765(20020916)8:18<4191::AID-CHEM4191>3.0.CO;2-S.

Fang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, et al. (2006). A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Current Microbiology*, 53 (6), 510-515. Doi: 10.1007/s00284-006-0260-x.

Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., García-Parrilla, M. C. & Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513 (1), 113-118. Doi: 10.1016/j.aca.2004.02.028.

Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P. & Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonol. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 19651-19669. 10.3390/ijms141019651.

Fragopoulou, E., Nomikos, T., Karantonis, H. C., Apostolakis, et al. (2007). Biological activity of acetylated phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (1), 80-89. Doi: 10.1021/jf0627221.

Fuggetta, M. P., Fuggetta, M. & Mattivi, F. (2011). The immunomodulating activities of resveratrol glucosides in humans. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3, 81-90.

Gaber, Y. (2012). *Hydrolases as Catalysts for Green Chemistry and Industrial Applications: Esterase, Lipase and Phytase*. Printed by Media-Tryck, Lund University, Sweden.

Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, et al. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal

Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. Doi: 10.1155/2015/837042.

Gao, Y., Chen, T., Lei, X., Li, Y., Dai, et al. (2016). Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury. *Molecular Medicine Reports*, 14 (6), 5481-5488. Doi: 10.3892/mmr.2016.5936.

Gilly, R., Mara, D., Oded, S. & Zohar, K. (2001). Resveratrol and a novel tyrosinase in Carignan grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(3):1479-85.

Goswami, A. & Stewart, J. D. (2015). *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. Capítulo 3. Academic Press.

Graber, M., Irague, R., Rosenfeld, E., Lamare, et al. (2007). Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774 (8), 1052-1057. Doi: 10.1016/j.bbapap.2007.05.013.

Grunwald, P. (2014). *Industrial Biocatalysis*. Volume I, Capítulo 16. CRC Press.

Gu, H., Li, K., Li, X., Yu, X., Wang, et al. (2016). Oral Resveratrol Prevents Osteoarthritis Progression in C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 8 (4), 233. Doi: 10.3390/nu8040233.

Guncheva, M., Tashev, E., Zhiryakova, D., Tosheva, T. & Tzokova, N. (2011). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous- containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. *Process Biochemistry*, 46 (4), 923-930. Doi: 10.1016/j.procbio.2011.01.002.

Gutzeit, H. O. & Ludwig-Muller, J. (2014). *Plant Natural Products: Synthesis, Biological Functions and Practical Applications*. Capítulo 1. 1ª Edição, Wiley Blackwell, Weinheim.

Hammerbacher, A., Ralph, S. G., Bohlmann, J., Fenning, et al. (2011). Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection. *Plant physiology*, 157 (2), 876-90. Doi: 10.1104/pp.111.181420.

He, Q. W., Xia, Y. P., Chen, S. C., Wang, Y., Huang, M., Huang, et al. (2013). Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation. *Molecular Neurobiology*, 47 (3), 976-987. Doi: 10.1007/s12035-013-8396-8.

- Henry-Vitrac, C., Desmoulière, A., Girard, D., Mérillon, J. M. & Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-polidatina by small intestinal epithelial cells. *European Journal of Nutrition*, 45 (7), 376-382. Doi: 10.1007/s00394-006-0609-8.
- Houillé, B., Papon, N., Boudesocque, L., Bourdeaud, E., Besseau, et al. (2014). Antifungal Activity of Resveratrol Derivatives against Candida Species. *Journal of Natural Products*, 77 (7), 1658-1662. Doi: 10.1021/np5002576.
- Huang, S. S., Cheng, H., Tang, C. M., Nien, M. W., Huang, Y. S., Lee, et al. (2013). Anti-oxidative, anti-apoptotic, and pro-angiogenic effects mediate functional improvement by sonic hedgehog against focal cerebral ischemia in rats. *Experimental Neurology*, 247, 680-688. Doi: 10.1016/j.expneurol.2013.03.004.
- Huang, X. & Mazza, G. (2011). Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, polidatina and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (25), 3890-3899. Doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.049.
- Iftitah, E. D., Srihardyastuti, A. & Ariefin, M. (2017). The activity of Rhizomuchor miehei lipase as a biocatalyst in enzymatic acylation of cyclic alcohol. *AIP Conference Proceedings*, 1823. Doi: 10.1063/1.4978190.
- Illanes, A. (2012). *Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L. & Castro, G. R. (2008). Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48-57. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.050.
- Illanes, A.; Wilson, L. & Vera, C. (2014). Problem Solving in Enzyme Biocatalysis. Capítulo 1. 1ª edição, John Wiley & Sons.
- Inoue, A. & Horikoshi, K. (1989). A Pseudomonas thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 338 (6212), 264-266. Doi: 10.1038/338264a0.
- Ishihara, K. & Nakajima, N. (2003). Structural aspects of acylated plant pigments: Stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23 (2-6), 411-417. Doi: 10.1016/S1381-1177(03)00106-1.
- Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4), 390-397. Doi: 10.1016/S0958-1669(02)00341-5.

- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Meunier, et al. (1995). Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (2), 316-319. Doi: 10.1021/jf00050a010.
- Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, et al. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors*, 36 (5), 331-341. Doi: 10.1002/biof.108.
- Ji, H., Zhang, X., Du, Y., Liu, H., Li, S. & Li, L. (2012). 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*, 87 (1), 50-59. Doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.09.021.
- Jiang, Q., Yi, M., Guo, Q., Wang, C., Wang, H., Meng, et al. (2015). Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunopharmacology*, 29 (2), 370-376. Doi: 10.1016/j.intimp.2015.10.027.
- Jin, S., Luo, M., Wang, W., Zhao, C., Gu, et al. (2013). Biotransformation of polydatin to resveratrol in *Polygonum cuspidatum* roots by highly immobilized edible *Aspergillus niger* and Yeast. *Bioresource Technology*, 136, 766-770. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.027.
- Jing, X., Cheng, W., Wang, S., Li, P. & He, L. (2016). Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway. *Oncology Reports*, 35 (1), 472-478. Doi: 10.3892/or.2015.4384.
- Kaldas, M. I., Walle, U. K. & Walle, T. (2003). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55 (3), 307-312. Doi: 10.1211/002235702612.
- Kapetanovic, I. M., Muzzio, M. Huang, Z., Thompson, T. N. & McCormick, D. L. (2011). Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68 (3), 593-601. Doi: 10.1007/s00280-010-1525-4.
- karikumar, K. B. & Aggarwal, B. B. (2008). Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7 (8), 1020-1037. Doi: 10.4161/cc.7.8.5740.

Kasiotis, K. M., Pratsinis, H., Kletsas, D. & Haroutounian, S. A. (2013). Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 112-120. Doi: 10.1016/j.fct.2013.03.038.

Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Tsironis, L., Tselepis, A. D. & Stamatis, H. (2006). Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology*, 123 (4), 491-503. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.022.

Khan, M. & Khan, F. (2015). Principles of Enzyme Technology. Capítulo 1, 2. PHI Learning Pvt. Ltd.

Khmelnitsky, Y. L., Levashov, A. V., Klyachko, N. L. & Martinek, K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme and Microbial Technology*, 10 (12), 710-724. Doi: 10.1016/0141-0229(88)90115-9.

Kim, Y. N., Choe, S. R., Cho, K. H., Cho, D. Y., Kang, et al. (2017). Resveratrol suppresses breast cancer cell invasion by inactivating a RhoA/YAP signaling axis. *Experimental and Molecular Medicine*, 49 (2), 296-299. Doi: 10.1038/emm.2016.151.

Kimura, Y. & Okuda, H. (2000). Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine, on tumour growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (10), 1287-1295. Doi:10.1211/0022357001777270.

Kiselev, K. V., Grigorichuk, V. P., Ogneva, Z. V., Suprun, A. R. & Dubrovina, A. S. (2016). Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis*. *Phytochemistry*, 131, 57-67. Doi: 10.1016/j.phytochem.2016.08.011.

Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. *Trends in Biotechnology*, 15 (3), 97-101. Doi: 10.1016/S0167-7799(97)01013-5.

Klibanov, M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in biochemical sciences*, 14(4), 141-4. Doi: 10.1016/0968-0004(89)90146-1.

Klibanov, M. (1990). Asymmetric Transformations Catalyzed by Enzymes in Organic Solvents. *Acc. Chem. Res.*, 23 (4), 114-120. Doi: 10.1021/ar00172a004.

Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H. & Kolisis, F. N. (2003). Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21 (1-2), 59-62. Doi: 10.1016/S1381-1177(02)00139-X.

- Krishna, S. H. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology advances*, 20, (3-4) 239-267. Doi: 10.1016/S0734-9750(02)00019-8.
- Krishna, S. H., Divakar, S., Prapulla, S. G. & Karanth, N. G. (2001). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of biotechnology*, 87, 193-201. Doi: 10.1016/S0168-1656(00)00432-6.
- Kuete, V. (2013). Medical plant Research in Africa. Capítulo 6. 1ª edição, Elsevier.
- Kuhnle, G., Spencer, J. P.E., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, et al. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272 (1), 212-217. Doi: 10.1006/bbrc.2000.2750.
- Kuo, C., Chen, B., Liu, Y., Chen, J. & Shieh, C. (2016). Production of Resveratrol by Polidatina Deglycosylation Using Cellulase. *Catalysts*, 6 (3), 32. Doi: 10.3390/catal6030032.
- Lanzilli, G., Cottarelli, A., Nicotera, G., Guida, et al. (2011). Anti-inflammatory Effect of Resveratrol and Polydatin by In Vitro IL-17 Modulation. *Inflammation*, 35 (1), 240-248. Doi: 10.1007/s10753-011-9310-z.
- Le, T., Jang, H., Nguyen, H. T.H., Doan, et al. (2017). Highly regioselective hydroxylation of polydatin, a resveratrol glucoside, for one-step synthesis of astringin, a piceatannol glucoside, by P450 BM3. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 34-42. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.11.003.
- Li, C., Tan, T., Zhang, H. & Feng, W. (2010). Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents: Insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (37), 28434-28441. Doi: 10.1074/jbc.M110.136200.
- Li, Y. R., Li, S. & Lin, C. C. (2017). Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *BioFactors*, 44 (1), 69-82. Doi: 10.1002/biof.1400.
- Li, Y., Xia, Y., Wang, Y., Mao, L., Gao, Y., He, et al. (2013). Sonic hedgehog (Shh) regulates the expression of angiogenic growth factors in oxygen-glucose-deprived astrocytes by mediating the nuclear receptor NR2F2. *Molecular Neurobiology*, 47 (3), 967-975. Doi: 10.1007/s12035-013-8395-9.
- Liese, A., Seelbach, K. & Wandrey, C. (2008). Industrial Biotransformations. Capítulo 3. John Wiley & Sons.
- Likhtenshtein, G. (2010). Stilbenes: Applications in Chemistry, Life Sciences and Materials Science. Capítulo 1, 7. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Lin, C. Y., Hsiao, W. C., Wright, D. E., Hsu, C. L., Lo, et al. (2013). Resveratrol activates the histone H2B ubiquitin ligase, RNF20, in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 5 (2), 790-800. Doi: 10.1016/j.jff.2013.01.025.

Ling, Y., Chen, G., Deng, Y., Tang, H., Ling, L., Zhou, et al. (2016). Polydatin post-treatment alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury by promoting autophagic flux. *Clinical Science*, 130 (18), 1641-1653. Doi: 10.1042/CS20160082.

Lippi, G., Franchini, M., Favaloro, E. J. & Targher, G. (2010). Moderate red wine consumption and CVD risk: Beyond the French Paradox. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36 (1), 59-70. Doi: 10.1055/s-0030-1248725.

Liu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Wu, J., Peng, et al. (2011). Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to polydatin-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112 (12), 3695-3703. Doi: 10.1002/jcb.23303.

Livingston, J. R., Peterson, J. J., Martinez, G. A., Peck, C. J., Garrett, et al. (2015). The Antioxidant and DNA Repair Activities of Resveratrol, Piceatannol, and Pterostilbene. *Journal of Food Research*, 4 (5), 9. Doi: 10.5539/jfr.v4n5p9.

Lobedanz, S., Damhus, T., Borchert, T. V., Hansen, et al. (2016). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Capítulo 3. John Wiley & Sons.

Luo, T., Chen, B., Zhao, Z., He, N., Zeng, Z., Wu, et al. (2013). Histamine H2 receptor activation exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by disturbing mitochondrial and endothelial function. *Basic Research in Cardiology*, 108 (3). Doi: 10.1007/s00395-013-0342-4.

Lv, C., Zhang, L., Wang, Q., Liu, W., Wang, et al. (2007). Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug discovery therapeutics*, 1 (2), 108-118. Doi: 10.1002/bmc.

Macrae, A. R. & Hammond, R. C. (1985). Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3 (1), 193-217. Doi: 10.1080/02648725.1985.10647813.

Marel, A. K., Lizard, G., Izard, J. C., Latruffe, N. & Delmas, D. (2008). Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 25 (5), 538-548. Doi: 10.1002/mnfr.200700185.

- Marier, J. F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J. P. & Ducharme, M. P. (2002). Metabolism and Disposition of Resveratrol in Rats: Extent of Absorption, Glucuronidation, and Enterohepatic Recirculation Evidenced by a Linked-Rat Model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302 (1), 369-373. Doi: 10.1124/jpet.102.033340.
- Mathew, S., Hedström, M. & Adlercreutz, P. (2012). Enzymatic synthesis of polidatina glycosides by cyclodextrin glucanotransferase. *Process Biochemistry*, 47 (3), 528-532. Doi: 10.1016/j.procbio.2011.11.012.
- Mattison, J. A., Wang, M., Bernier, M., Zhang, J., Park, S. S., Maudsley, et al. (2014). *Cell Metabolism*, 20 (1), 183-190. Doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.018.
- Mattivi, F., Reniero, F. & Korhammer, S. (1995). Isolation, Characterization, and Evolution in Red Wine Vinification of Resveratrol Monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1820-1823. Doi: 10.1021/jf00055a013.
- Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A. D., Kolisis, et al. (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*, 116 (3), 295-304. Doi:10.1016/j.jbiotec.2004.12.002.
- Meng, Q. H., Liu, H. B. & Wang, J. B. (2016). Polydatin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by decreasing apoptosis and oxidative stress through activating sonic hedgehog signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 215-225. Doi: 10.1016/j.fct.2016.07.032.
- Meng, Q., Liu, H. & Wang, J. (2015). Protective effects of polydatin on HK-2 cells against oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced injury by regulating Sonic hedgehog through PI3K/Akt signaling pathway). *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 31 (11), 1452-1457.
- Messina, F., Guglielmini, G., Curini, M., Orsini, S., Gresele, P. & Marcotullio, M. C. (2015). Effect of substituted stilbenes on platelet function. *Fitoterapia*, 105, 228-233. Doi: 10.1016/j.fitote.2015.07.009.
- Miller, C., Austin, H., Posorske, L. & Gonzalez, J. (1988). Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (6), 927-931. Doi: 10.1007/BF02544512.

Moo-Young, M. (2011). In *Comprehensive Biotechnology: Principles, Applications and Regulations in Industry, Agriculture, Medicine and the Environment*. Capítulo 1.3.1. 2ª Edição, Elsevier.

Morales-Gonzales, J. A. (2013). *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: A role for antioxidants*. Capítulo 4. IntechOpen.

Mussatto, S. I. (2015). Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin. *Coffee in Health and Disease Prevention*, 93-106. Doi: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00011-5.

Nagaoka, I., Niyonsaba, F., Tsutsumi-Ishii, Y., Tamura, H. & Hirata, M. (2008). Evaluation of the effect of human beta-defensins on neutrophil apoptosis. *International immunology*, 20 (4), 543-553. Doi: 10.1093/intimm/dxn012.

Nicolosi, G., Spatafora, C. & Tringali, C. (2002). Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 16 (5-6), 223-229. Doi: 10.1016/S1381-1177(01)00066-2.

Ogas, T., Kondratyuk, T. P. & Pezzuto, J. M. (2013). Resveratrol analogs: Promising chemopreventive agentes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1290 (1), 21-29. Doi: 10.1111/nyas.12196.

Orsini, F., Pelizzoni, F., Bellini, B. & Miglierini, G. (1997). Synthesis of biologically active polyphenolic glycosides (combretastatin and resveratrol series). *Carbohydrate Research*, 301 (3-4), 95-100. Doi: 10.1016/S0008-6215(97)00087-6.

Ozcan, T., Akpınar-Bayizit, A., Yılmaz-Ersan, L. & Delikanlı, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5 (5), 393-396. Doi: 10.7763/IJCEA.2014.V5.416.

Pan, Y., Zhang, H., Zheng, Y., Zhou, J., Yuan, et al. (2017). Resveratrol Exerts Antioxidant Effects by Activating SIRT2 to Deacetylate Prx1. *Biochemistry*, 56 (48), 6325-6328. Doi: 10.1021/acs.biochem.7b00859.

Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J & Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetic. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282 (5), 1161-1168. Doi:10.1006/bbrc.2001.4705.

- Park, E. J. & Pezzuto, J. M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852 (6), 1071-1113. Doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.014.
- Patel, R. N. (2016). *Green Biocatalysis*. Capítulo 1. John Wiley & Sons.
- Paulis, L., Fauconnier, J., Cazorla, O., Thireau, J., Soleti, R., Vidal, et al. (2015). Activation of sonic hedgehog signaling in ventricular cardiomyocytes exerts cardioprotection against ischemia reperfusion injuries. *Scientific Reports*, 5. Doi: 10.1038/srep07983.
- Phan, H. T. T., Yoda, T., Chahal, B., Morita, et al. (2014). Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838 (10), 2670-2677. Doi: 10.1016/j.bbamem.2014.07.001.
- Pleiss, J., Fischer, M. & Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93 (1-2), 67-80. Doi: 10.1016/S0009-3084(98)00030-9.
- Ramawat, K. & Mérillon, J. (2008). *Bioactive molecules and medical plants*. Capítulo 2. Springer Science & Business Media.
- Ravagnan, G., De Filippis, A., Carteni, M., De Maria, et al. (2013). Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces  $\beta$ -defensin production and reduces inflammatory response. *Inflammation*, 36 (1), 26-34. Doi: 10.1007/s10753-012-9516-8.
- Regev-shoshani, G., Shoseyov, O., Bilkis, I. & Kerem, Z. (2003). Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochemical Journal*, 374 (1), 157-163. Doi:10.1042/bj20030141.
- Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K. & Karjalainen, R. O. (2015). Polyphenol stilbenes: Molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. Doi: 10.1155/2015/340520.
- Renaud, S. & De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339 (8808), 1523-1526. Doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-F.
- Riba, A., Deres, L., Sumegi, B., Toth, K., Szabados, et al. (2017). Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. Doi: 10.1155/2017/6819281.

- Rivière, C., Pawlus, A. D. & Mérillon, J. M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29 (11), 1317. Doi: 10.1039/c2np20049j.
- Rizvi, S. I. & Pandey, K. B. (2010). Activation of the erythrocyte plasma membrane redox system by resveratrol: A possible mechanism for antioxidant properties. *Pharmacological Reports*, 62 (4), 726-732. Doi: 10.1016/S1734-1140(10)70330-3.
- Roupe, K., Remsberg, C., Yanez, J. & Davies, N. (2006). Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. *Current Clinical Pharmacology*, 1 (1), 81-101. Doi:10.2174/157488406775268246.
- Ruhmann, S., Treutter, D., Fritche, S., Briviba, K. & Szankowski, I. (2006). Polidatina (resveratrol glucoside) synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13), 4633-4640. Doi: 10.1021/jf060249l.
- Salem, J. H., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, et al. (2010). Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry*, 45, (3), 382-389. Doi: 10.1016/j.procbio.2009.10.012.
- Sebastià, N., Montoro, A., Mañes, J. & Soriano, J. M. (2012). A preliminary study of presence of resveratrol in skins and pulps of European and Japanese plum cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (15), 3091-3094. Doi: 10.1002/jsfa.5759.
- Seth, S., Chakravorty, D., Dubey, V. K. & Patra, S. (2014). An insight into plant lipase research - Challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, 95, 13-21. Doi: 10.1016/j.pep.2013.11.006.
- Sharma, S. K. & Mudhoo, A. (2011). *Green Chemistry for Environmental Sustainability*. Capítulo I. CRC Press.
- Sheldon, R. A., Arends, A. & Hanefeld, U. (2007). *Green Chemistry and Catalysis*. Capítulo I. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Siemann, E. H. & Crease, L. L. (1992). Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American journal enology and viticulture*, 43 (1), 48-52.
- Silva, F., Figueiras, A., Gallardo, E., Nerín, C. & Domingues, F. C. (2014). Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids. *Food Chemistry*, 145, 115-125. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.034.

- Sobolev, V. S. (2008). Localized production of phytoalexins by peanut (*Arachis hypogaea*) kernels in response to invasion by *Aspergillus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (6), 1949-1954. Doi: 10.1021/jf703595w.
- Soto-Hernández, M. (2017). *Phenolic compounds: Biological activity*. Capítulo I. IntechOpen.
- Spencer, J. & Crozier, A. (2012). *Flavonoids and related compounds: Bioavailability and Function*. Capítulo I. CRC Press.
- Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, et al. (2013). Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catalysis*, 3 (12), 2823-2836. Doi: 10.1021/cs400684x.
- Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, et al. (2001). Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (25), 22586-22594. Doi:10.1074/jbc.M101846200.
- Stojanović, S. & Brede, O. (2002). Elementary reactions of the antioxidant action of trans-stilbene derivatives: resveratrol, pinosylvin and 4-hydroxystilbene. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4 (5), 757-764. Doi: 10.1039/b109063c.
- Su, D., Chen, Y., Liu, M., Liu, D., Cui, et al. (2013). Comparison of Polidatina and Resveratrol in Antioxidation and Antiproliferation Activities In Vitro. *PLOS ONE*, 8 (1). Doi:10.1371/journal.pone.0054505.
- Sugathan, S., Pradeep, N. S. & Abdulhameed, S. (2017). *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*. Volume 2: Exploring Potential Biomolecules. Springer.
- Takahashi, M. & Tanaka, J. (2017). GABAergic modulation of noradrenaline release caused by blood pressure changes in the rat median preoptic area. *NeuroReport*, 28 (9), 485-491. Doi: 10.1097/WNR.0000000000000780.
- Takeda, Y., Aono, R. & Doukyu, N. (2006). Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Extremophiles*, 10 (4), 269-277. Doi: 10.1007/s00792-005-0494-8.
- Tao, J. & Kazlauskas, R. J. (2011). *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*. Capítulo I. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

- Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, et al. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11 (2), 114-119. Doi: 10.1016/S0955-2863(99)00080-7.
- Teng, R., Ang, C., McManus, D., Armstrong, et al. (2004). Regioselective acylation of ginsenosides by Novozyme 435 to generate molecular diversity. *Helvetica Chimica Acta*, 87 (7), 1860-1872. Doi: 10.1002/hlca.200490165.
- Tood, A. E., Orengo, C. A. & Thornton, J. M. (2001). Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *Journal of molecular biology*, 307 (4), 1113-1143. Doi: 10.1006/jmbi.2001.4513.
- Torres, C. & Otero, C. (1996). Influence of the organic solvents on the activity in water and the conformation of *Candida rugosa* lipase: Description of a lipase-activating pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (8), 594-600. Doi: 10.1016/S0141-0229(97)82686-5.
- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2010). Regioselective lipase-catalyzed synthesis of 3-o-acyl derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2), 807-813. Doi: 10.1021/jf903210q.
- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Parra, J. L., Comelles, et al. (2011). Enzymatic synthesis of  $\alpha$ -glucosides of resveratrol with surfactant activity. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353 (7), 1077-1086. Doi: 10.1002/adsc.201000968.
- Torres-Gavilán, A., Castillo, E. & López-Munguía, A. (2006). The amidase activity of *Candida antarctica* lipase B is dependent on specific structural features of the substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41 (3-4), 136-140. Doi: 10.1016/j.molcatb.2006.06.001.
- Trodler, P. & Pleiss, J. (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology*, 8, 1-10. Doi: 10.1186/1472-6807-8-9.
- Udenigwe, C. C., Ramprasath, V. R., Aluko, R. E. & Jones, P. J. H. (2008). Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews*, 66 (8), 445-454. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00076.x.
- Udenigwe, C. C., Ramprasath, V. R., Aluko, R. E. & Jones, P. J. H. (2008). Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews*, 66 (8), 445-454. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00076.x.
- Ünsalan, O., Kuş, N., Jarmelo, S. & Fausto, R. (2015). *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 81-94. Doi: 10.1016/j.saa.2013.10.050.

- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, et al. (2005). Determination of stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, trans-polidatina, cis- and trans-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (14), 5664-5669. Doi: 10.1021/jf050122g.
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderline, R., Valls, J., Richard, et al. (2005). Determination of Stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, trans-polidatina, cis- and trans-resveratrol, E-viniferin) in Brazilian Wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 5664-5669. Doi: 10.1021/jf050122g.
- Vitrac, X., Desmoulière, A., Brouillaud, B., Krisa, et al. (2003). Distribution of [ $^{14}$ C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sciences*, 72 (20), 2219-2233. Doi: 10.1016/S0024-3205(03)00096-1.
- Vlachogianni, I. C., Fragopoulou, E., Kostakis, I. K. & Antonopoulou, S. (2015). In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chemistry*, 177, 165-173. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.092.
- Waffo-Téguo, P., Hawthorne, M. E., Cuendet, M., Mérillon, et al. (2001). Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutrition and Cancer*, 40 (2), 173-179. Doi: 10.1207/S15327914NC402\_14.
- Wahba, M. G.F., Messiha, B. A. S. & Abo-Saif, A. A. (2015). Protective effects of fenofibrate and resveratrol in an aggressive model of rheumatoid arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54 (9), 1705-1715. Doi: 10.3109/13880209.2015.1125931.
- Walle, T., Hsieh, F., Delegge, M. H., Oatis, J. E. & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition*, 32 (12), 1377-1382. Doi: 10.1124/dmd.104.000885.sponding.
- Wang, C., Luo, Y., Lu, J., Wang, Y. & Sheng, G. (2014). Mitochondrial Dysfunction and Electron Transport Chain Complex Defect in a Rat Model of Tenofovir Disoproxil Fumarate Nephrotoxicity. *Journal of biochemical molecular toxicology*, 28 (6), 246-255. Doi: 10.1002/jbt.
- Wang, G., Zhang, M., Zhong, Q., Lei, et al. (2016 b). Protective effects of resveratrol against hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity on human erythrocytes. *Journal of Functional Foods*, 23, 144-153. Doi: 10.1016/j.jff.2016.02.031.

- Wang, L. X., Heredia, A., Song, H., Zhang, *et al.* (2004). Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (10), 2448-2457. Doi: 10.1002/jps.20156.
- Wang, X. L., Li, T., Li, J. H., Miao, S. Y. & Xiao, X. Z. (2017). The Effects of Resveratrol on Inflammation and Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Molecules*, 22 (9), 1529. Doi: 10.3390/molecules22091529.
- Wang, Z. H., Bi, Y. H., Yang, R. L., Zhao, X. J., Jiang, *et al.* (2016 a). Highly efficient enzymatic synthesis of novel polydatin prodrugs with potential anticancer activity. *Process Biochemistry*, 52, 209-213. Doi: 10.1016/j.procbio.2016.09.028.
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E. & Kindl, H. (1994). Structural Organization and Differential Expression of 3 Stilbene Synthase Genes Located on a 13-Kb Grapevine Dna Fragment. *Plant Molecular Biology*, 26 (2), 667-677. Doi: 10.1007/BF00013752.
- Wohlgemuth, R. (2010). Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (6), 713-724. Doi: 10.1016/j.copbio.2010.09.016.
- Xiao, K., Zhang, H. J., Xuan, L. J., Zhang, *et al.* (2008). Stilbenoids: Chemistry and bioactivities. *Studies in Natural Products Chemistry*, 34, 453-646. Doi: 10.1016/S1572-5995(08)80032-4.
- Xiao, K., Zhang, H. J., Xuan, L. J., Zhang, *et al.* (2008). Stilbenoids: Chemistry and bioactivities. *Studies in Natural Products Chemistry*, 453-646. Doi: 10.1016/S1572-5995(08)80032-4.
- Xie, X., Peng, J., Huang, K., Huang, J., Shen, *et al.* (2012). Polydatin ameliorates experimental diabetes-induced fibronectin through inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway in rat glomerular mesangial cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 362 (1-2), 183-193. Doi: 10.1016/j.mce.2012.06.008.
- Xing, W. W., Wu, J. Z., Jia, M., Du, *et al.* (2009). Effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* on lipid profile in hyperlipidemic rabbits. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63 (7) 457-462. Doi: 10.1016/j.biopha.2008.06.035.
- Xu, G., Kuang, G., Jiang, W., Jiang, R. & Jiang, D. (2016 b). Polydatin promotes apoptosis through upregulation the ratio of Bax / Bcl-2 and inhibits proliferation by attenuating the  $\beta$ -catenin signaling in human osteosarcoma cells. *American journal of translational research*, 8 (2), 922-931.

- Xu, L. Q., Xie, Y. L., Gui, S. H., Zhang, X., Mo, et al. (2016 a). Polydatin attenuates galactose-induced liver and brain damage through its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in mice. *Food & Function*, 7 (11), 4545-4555. Doi: 10.1039/C6FO01057A.
- Xue, L., Wu, K., Qiu, H., Huang, B., Chen, et al. (2017). Polydatin exhibits the hepatoprotective effects through PPAR- $\alpha$ / $\beta$  signaling pathway in Streptozocin-induced diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 36, 341-347. Doi: 10.1016/j.jff.2017.07.015.
- Yan, F., Sun, X., & Xu, C. (2018). Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15 (2), 1728-1734. Doi: 10.3892/etm.2017.5537.
- Yang, B. & Zhao, S. (2017). Polydatin regulates proliferation, apoptosis and autophagy in multiple myeloma cells through mTOR/p70s6k pathway. *Onco Targets and Therapy*, 10, 935-944. Doi: 10.2147/OTT.S123398.
- Yang, D. K. & Kang, H. S. (2018). Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomolecules and Therapeutics*, 26 (2), 130-138. Doi: 10.4062/biomolther.2017.254.
- Yu, C. K. Y., Springob, K., Schmidt, J., Nicholson, R. L., Chu, et al. (2005). A Stilbene Synthase Gene (SbSTS1) Is Involved in Host and Nonhost Defense Responses in Sorghum. *Plant Physiology*, 138 (1), 393-401. Doi: 10.1104/pp.105.059337.
- Zaks, A. & Klivanov, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82 (10), 3192-3196. Doi: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb45697.x.
- Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, et al. (2008). Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *British Journal of Nutrition*, 100 (1), 188-196. Doi: 10.1017/S0007114507882997.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395. Doi: 10.1038/415389a.
- Zhang, D., Li, X., Hao, D., Li, et al. (2009). Systematic purification of polydatin, resveratrol and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. *Separation and Purification Technology*, 66 (2), 329-339. Doi: 10.1016/j.seppur.2008.12.013.

Zhang, J., Zhou, L., Zhang, P., Liu, et al. (2015). Extraction of polydatin and resveratrol from *Polygonum cuspidatum* root: Kinetics and modeling. *Food and Bioprocess Processing*, 94 (76), 518-524. Doi: 10.1016/j.fbp.2014.07.011.

Zhang, Y., Zhuang, Z., Meng, Q., Jiao, Y., Xu, J. & Fan, S. (2014). Polydatin inhibits growth of lung cancer cells by inducing apoptosis and causing cell cycle arrest. *Oncology Letters*, 7 (1), 395-301. Doi: 10.3892/ol.2013.1696.

Zhao, X., Cui, Q., Fu, Q., Song, X., Jia, et al. (2017). Antiviral properties of resveratrol against pseudorabies virus are associated with the inhibition of I $\kappa$ B kinase activation. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-11. Doi: 10.1038/s41598-017-09365-0.

Zhou, S., Yang, R., Teng, Z., Zhang, B., Hu, et al. (2009). Dose-dependent absorption and metabolism of trans-polydatin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, (11), 4572-4579. Doi: 10.1021/jf803948g.

Zhu, X., Liu, Q., Wang, M., Liang, M., Yang, et al. (2011). Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- $\alpha$  induced inflammation in Fibroblasts. *PLOS ONE*, 6 (10). Doi: 10.1371/journal.pone.0027081.

Zou, T., Yang, Y., Xia, F., Huang, A., Gao, et al. (2013). Resveratrol Inhibits CD4<sup>+</sup> T cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. *PLOS ONE*, 8 (9). Doi: 10.1371/journal.pone.0075139.